

Pathogenese der Immunsuppression nach stumpfem Weichteiltrauma

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Florian Wirsdörfer

aus Essen
Juni 2011

„Die Wissenschaft ist ein erstklassiges Möbelstück für das Oberstübchen eines Mannes, der gesunden Menschenverstand im Erdgeschoss hat.“

Oliver Wendell Holmes sen. (1809-94)

Für Alle, die mich bis hierhin gebracht und begleitet haben

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der AG Chirurgische Forschung, Klinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Stefanie B. Flohé

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Verena Jendrossek

3. Gutachter: -

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. sc. nat. Ann Ehrenhofer-Murray

Tag der mündlichen Prüfung: 24.08.2011

1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem – Ein Überblick	1
1.1.1. Das angeborene Immunsystem	2
1.1.1.1. Dendritische Zellen.....	2
1.1.1.2. NK-Zellen	4
1.1.1.3. Lösliche Komponenten	5
1.1.2. Das adaptive Immunsystem.....	7
1.2. Antigenerkennung, Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Lymphozyten	10
1.3. Trauma: Die Rolle des Immunsystems	13
1.3.1. Molekulare und zelluläre Komponenten der Immunantwort nach Trauma	15
1.4. Ziele der Arbeit	18
2. Material	20
2.1. Verbrauchsmaterial	20
2.2. Labor-Geräte	20
2.3. Chemikalien	20
2.4. Puffer, Lösungen, Reagenzien und Bakterien.....	21
2.4.1. Puffer und Lösungen.....	21
2.4.2. Reagenzien und Stimuli	21
2.4.3. Bakterien.....	22
2.5. Seren und Medien.....	22
2.5.1. Seren	22
2.5.2. Zellkulturmedium.....	23
2.5.3. Medium für Bakterien	23
2.6. Antikörper	23
2.6.1. Antikörper zur Anreicherung verschiedener muriner Zelltypen	24
2.7. Versuchstiere.....	24
3. Methoden.....	26
3.1. Versuchstiere.....	26
3.1.1. Tier-Modell zur Induktion eines Weichteiltraumas bei der Maus.....	26
3.1.2. Lungeninfektions-Modell mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bei der Maus	27
3.1.2.1. Anzucht des Bakterienstammes <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
3.1.2.2. Infektion der Versuchstiere mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28

3.1.2.3.	Bestimmung der bakteriellen Beladung in der Lunge	28
3.1.3.	Applikationsarten	28
3.1.4.	Isolierung von Lymphknotenzellen.....	29
3.1.5.	Isolierung von Milzzellen.....	30
3.1.6.	Isolierung von zellen aus dem Muskel	31
3.1.7.	Isolierung von Knochenmarkzellen und Differenzierung von DC	32
3.1.8.	Entnahme der Lunge	33
3.2.	Kommerzielle Standardtestverfahren	34
3.2.1.	Anreicherung von murinen Zelltypen mittels MACS.....	34
3.2.1.1.	Prinzip	34
3.2.1.2.	Isolation von CD3 ⁺ T-Zellen aus den Lymphknoten	35
3.2.1.3.	Gewinnung von APZ aus der Milz	36
3.2.2.	Bestimmung der Proliferation mittels Cell Tracer Kit.....	37
3.2.3.	Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie	38
3.2.3.1.	Prinzip	39
3.2.3.2.	Färbungen von Zelloberflächenmolekülen	41
3.2.3.3.	Intrazelluläre Färbungen	41
3.2.4.	Zytokinnachweis mittels <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA)	42
3.2.5.	Zytokinquantifizierung in Zellkultur-Überständen	43
3.2.5.1.	Prinzip	43
3.2.5.2.	Maus IL-2-, IL-10-, IFN-gamma und TGF- β -ELISA	44
3.3.	Versuchsverlauf, Applikation und Zellkultur.....	45
3.3.1.	Untersuchung der antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung <i>in vivo</i>	45
3.3.2.	OVA-spezifische T-Zell-Aktivierung <i>in vitro</i>	46
3.4.	Statistische Analysen	47
4.	Ergebnisse	48
4.1.	Analyse der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung nach s.c. Antigen- Applikation	48
4.1.1.	Reinheit von CD3 ⁺ DO11.10 Zellen	49
4.1.2.	CD25 und CD69 Expression Antigen-spezifischer T-Zellen <i>in vivo</i>	50
4.1.3.	Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen <i>in vivo</i>	51
4.1.4.	Restimulation von LNC <i>in vitro</i>	51
4.1.5.	Zytokin-Expression im Antigen-spezifischen T-Zell-Assay <i>in vitro</i>	52
4.2.	Nachweis des Antigens in den poplitealen Lymphknoten	54
4.3.	Untersuchung einer beeinträchtigten Antigenpräsentation in den Lymphknoten.....	55

4.3.1.	CD25 und CD69 Expression Antigen-spezifischer T-Zellen <i>in vivo</i>	56
4.3.2.	Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen <i>in vivo</i>	57
4.3.3.	Zytokin-Expression im Antigen-spezifischen T-Zell-Assay <i>in vitro</i>	58
4.4.	Untersuchung der Beteiligung von endogenen T-Zellen bei der Entstehung einer Immundysfunktion.....	59
4.4.1.	Analyse eines Adoptivtransfers von T-Zellen in naive Versuchstiere.....	60
4.4.2.	Nachweis einer Beteiligung endogener T-Zellen im RAG-2 Knockout Modell	63
4.4.3.	Weitere Untersuchung endogener T-Zellen in einem T-Zell Assay <i>in vitro</i>	66
4.4.3.1.	Reinheit von CD3-negativen Milzzellen.....	66
4.4.3.2.	Zytokin-Expression im T-Zell Assay nach Stimulation <i>in vitro</i>	67
4.5.	Untersuchung der Beteiligung von NK-Zellen bei der Entstehung einer Immundysfunktion	68
4.5.1.	Effekt der Inaktivierung/ Depletion von NK-Zellen auf die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf den T-Zellen <i>in vitro</i>	70
4.5.2.	Effekt der NK-Zell-Inaktivierung/ Depletion auf die Zytokin-Expression der T-Zellen <i>in vitro</i>	71
4.5.3.	Oberflächenmoleküle auf NK-Zellen nach Trauma <i>in vivo</i>	72
4.6.	Charakterisierung der Immunsuppression nach Trauma im Lungeninfektionsmodell <i>in vivo</i>.....	73
4.7.	Charakterisierung von APZ im Muskel	74
4.7.1.	Expression von MHC-II und co-stimulatorischen Molekülen auf APZ im Muskel	75
4.8.	Analyse der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung nach i.m. Antigen-Applikation	78
4.8.1.	CD25 und CD69 Expression Antigen-spezifischer T-Zellen <i>in vivo</i>	78
4.8.2.	Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen <i>in vivo</i>	79
4.8.3.	Zytokin-Expression im Antigen-spezifischen T-Zell-Assay <i>in vitro</i>	80
4.9.	Umkehr der T_H-Zell Suppression nach Trauma über Dendritische Zellen im Muskel.....	82
4.9.1.	CD25 und CD69 Expression Antigen-spezifischer T-Zellen <i>in vivo</i>	83
4.9.2.	Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen <i>in vivo</i>	83
4.9.3.	Zytokin-Expression im Antigen-spezifischen T-Zell-Assay <i>in vitro</i>	84
5.	Diskussion	86
6.	Zusammenfassung.....	101
7.	Literaturverzeichnis	103

8. Anhang	117
8.1. Abkürzungsverzeichnis	117
8.2. Abbildungsverzeichnis	120
8.3. Tabellenverzeichnis	122
8.4. Danksagung	123
8.5. Lebenslauf	124
8.6. Erklärungen	126

1. EINLEITUNG

1.1. DAS IMMUNSYSTEM – EIN ÜBERBLICK

Das Immunsystem ist ein komplexes System von Zellen und Zellfunktionen in einem Lebewesen. Es dient der Abwehr von fremden Substanzen und Krankheitserregern (Pathogenen). Unter Immunität versteht man die Unempfindlichkeit des Organismus gegenüber äußeren Angriffen und seine Fähigkeit bestimmte Krankheitserreger ohne pathologische Erscheinungen zu eliminieren.

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Infektionen durch verschiedene Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten. Es setzt sich aus vielen Komponenten zusammen, die äußerst komplex und wohl reguliert miteinander agieren und kommunizieren. Das koordinierte Zusammenspiel der molekularen und zellulären Bestandteile bezeichnet man als „Immunantwort“, die dem Schutz des Organismus vor Befall durch körperfremde Partikel dient. Zudem sollte es im „Normalfall“ zu keiner Reaktion gegen körpereigene Strukturen kommen, ein Phänomen, das man als „Immunologische Toleranz“ beschreibt. Die Fähigkeit des Immunsystems zwischen eigenen und fremden Strukturen zu unterscheiden stellt somit die zentrale Basis für ein solches Schutzsystem dar und dient der Erhaltung der individuellen Integrität.

Bei den höher entwickelten Lebewesen bilden Haut und Schleimhäute die erste physikalische Abwehrlinie gegen Pathogene, die durch chemische Komponenten oder antimikrobielle Substanzen in Speichel, Mukus, Schweiß, Verdauungssäften oder anderen Sekreten ergänzt wird. Überwinden Pathogene diese ersten epithelialen Barrieren, kommen die Abwehrmechanismen des Immunsystems zum Zuge, die als „angeborene“ und „adaptive“ Immunantworten bezeichnet werden. Diese beiden Eckpfeiler bilden den aktiven Teil des Immunsystems. Beide Formen setzen sich aus zellulären und löslichen Komponenten zusammen. Wesentliche Unterschiede beider Formen der Abwehr liegen in den Mechanismen und Rezeptoren der Pathogenerkennung [83, 119].

1.1.1. DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM

Die Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität werden unmittelbar nach dem Fremdkontakt aktiviert. Alle Zellen des Immunsystems stammen von den gleichen Vorläuferzellen im Knochenmark ab, den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Aus diesen Stammzellen entwickeln sich lymphatische und myeloide Vorläuferzellen, die weiter zu B-Zellen, T-Zellen und Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) bzw. zu Monozyten, dendritischen Zellen (DC), Granulozyten und Makrophagen ausdifferenzieren.

Zu den Zellen der angeborenen Immunität gehören Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und DC, die Pathogene (immunogene Substanzen) phagozytieren und inflammatorische Mediatoren freisetzen. Darüber hinaus kann ein Teil der Phagozyten (DC und Makrophagen) nach Pathogen-Aufnahme und -Prozessierung Antigenpeptide über Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) der Klasse-I und Klasse-II den T-Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren.

1.1.1.1. DENDRITISCHE ZELLEN

DC sind die professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) des Immunsystems. Unreife DC entstehen im Knochenmark, wandern vom Blut in das Gewebe und verbleiben dort, bis sie Fremdartigene aufnehmen. Des Weiteren können DC auch aus Monozyten unter Einfluss bestimmter Zytokine (*granulocyte/macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) und Interleukin (IL)-4) entstehen [73, 194]. Unreife DC besitzen nur wenig MHC-Moleküle und co-stimulatorische B7-Proteine (*cluster of differentiation* (CD)80 und CD86). Größtenteils befinden sie sich in Oberflächenepithelien (z. B. in der Haut und den Schleimhäuten). Nach Phagozytose eindringender Mikroorganismen werden DC aktiviert und migrieren zu den nächstgelegenen Lymphknoten (LN), um dort das aufgenommene Antigen den T-Helferzellen (T_H-Zellen) zu präsentieren (s. Abb. 1.1).

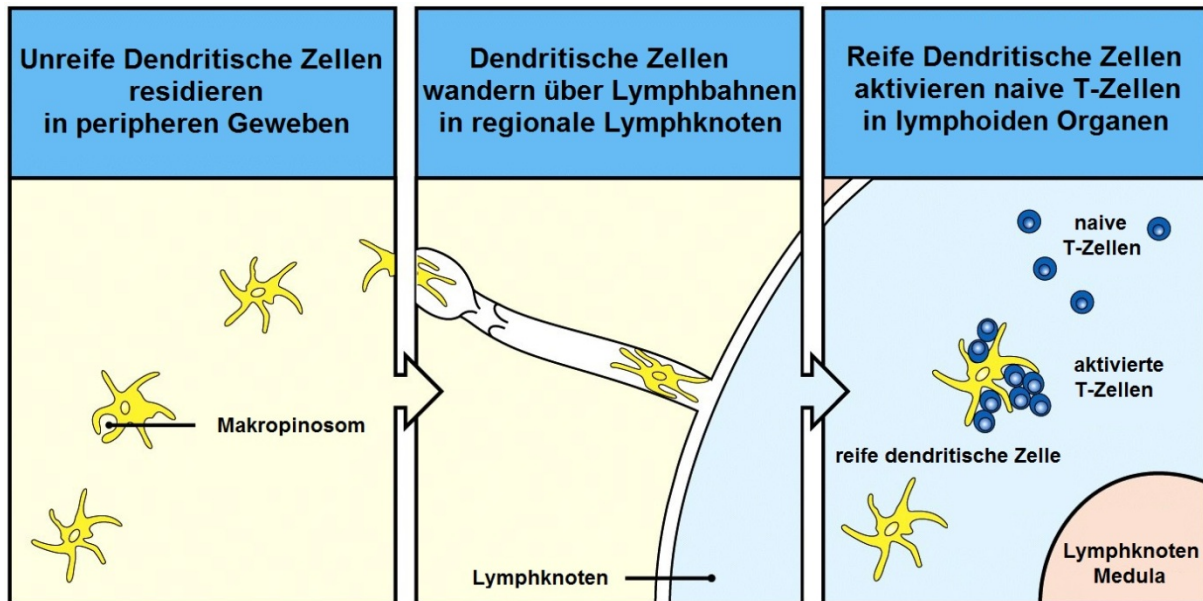


Figure 1-9 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008) (modifiziert)

Abb. 1.1 Induktion der angeborenen Immunität. In der Peripherie wird extrazelluläres Material über Phago- und Endozytose von unreifen Dendritischen Zellen aufgenommen. Die reifende Dendritische Zelle wandert nach Aufnahme des Antigens über die Lymphgefäße in das nächste lymphoide Organ. Dort aktiviert die reife Dendritische Zelle naive T-Zellen und vermittelt so die angeborene Immunität. Original [130] modifiziert.

Diese Migration kann auch durch Zytokine, wie z. B. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Prostaglandin E2 (PGE2), induziert werden [43, 102]. Auf der Wanderung zu den LN findet eine Reifung der DC statt. Dabei werden die Moleküle CD86 und CD40 verstärkt exprimiert und die Präsentation von MHC-Peptid-Komplexen verlängert und verstärkt. Als professionelle APZ sind DC jedoch anderen APC überlegen. Sie sind nicht mehr in der Lage Mikroorganismen aufzunehmen und dienen daher ausschließlich der Stimulation von Zellen des adaptiven Immunsystems. Durch die starke Expression von MHC, CD40 und CD86 sind reife DC die stärksten Stimulatoren naiver T-Zellen und spielen eine wichtige Rolle bei der Auslösung von Immunantworten durch Synthese des Zytokins IL-12 (s. a. Punkt 1.2) [10, 29].

Weiterhin gehören NK-Zellen und Mastzellen zur angeborenen Immunität. Ihre Abwehrmechanismen zeichnen sich durch eine unspezifische Antwort aus, d. h. die fremden Moleküle werden im eigentlichen Sinne nicht unterschieden.

1.1.1.2. NK-ZELLEN

NK-Zellen sind Effektorzellen der angeborenen Immunabwehr, welche die Fähigkeit besitzen, verschiedenste Zelltypen zu lysieren, einschließlich Tumorzellen und Virus-infizierter Zellen. Dies geschieht in Abwesenheit Antigen-spezifischer Erkennung und klonaler Expansion [179]. Für den Eliminationsprozess gibt es zwei Hauptmechanismen, welche beide Zellkontakt-abhängig sind. Der erste Signalweg beschreibt die Lyse der Zielzelle über zytotoxische Granula, wie Perforin und Granzyme, welche durch Störung der Membranintegrität die Apoptose in der Zielzelle induzieren. Der zweite Weg beschreibt eine Rezeptor-vermittelte Einleitung der Caspase-abhängigen Apoptose (z. B. über Fas/CD95; TRAIL), wie sie bei Virus-infizierten Zellen vorkommt [171]. Die zytolytische Aktivität von NK-Zellen wird hauptsächlich durch IL-2, aber auch durch IL-12 und Interferon (IFN) bestimmt [37, 154]. Aktivierte NK-Zellen besitzen unter anderem die Fähigkeit Zielzellen zu lysieren, welche resistent gegenüber ruhenden NK-Zellen sind.

Neben der zytotoxischen Funktion verfügen NK-Zellen auch über regulatorische Fähigkeiten. So können sie Zytokine, wie IFN- γ , TNF- α und GM-CSF sezernieren, und großen Einfluss auf Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems nehmen [180, 185]. NK-Zellen stehen in inflammatorischen Geweben und sekundären lymphoiden Organen in engem Kontakt zu DC [8, 59]. Diese Interaktion läuft sowohl über Zellkontakt als auch über Zytokine [69]. Von NK-Zellen produziertes IFN- γ fördert die Synthese des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 durch DC, welches wiederum die NK-Zelle stimuliert. Diese bidirektionale Interaktion führt zur Aktivierung beider Zelltypen [69]. Neben dieser aktivierenden DC-NK-Zell Interaktion kommt es auch zur Beseitigung von unreifen DC durch NK-Zellen. Diese Rezeptor-vermittelte Apoptose der DC, durch NKp30–NKp30L Interaktion, sowie die Hemmung von DC durch Interaktion von QA-1^b auf DC und den inhibierenden CD94/NKG2A Rezeptoren auf NK-Zellen, hat eine regulierende Funktion der DC durch Begrenzung einer Immunantwort [58, 149]. Es wird weiterhin vermutet, dass diese Beseitigung unreifer DC eine Art „Kontrollschalter“ ist. Durch diesen Prozess wird die Qualität einer sich entwickelnden Immunantwort bestimmt, indem, für eine effiziente Antigenpräsentation und Einleitung einer effektiven adaptiven Immunantwort, ungeeignete DC eliminiert werden [26, 112, 128]. Eine Rekrutierung und Aktivierung

von NK-Zellen in lymphoide Gewebe durch Induktion von IL-12 liefert somit eine erste Quelle für IFN- γ und fördert dadurch eine Typ-T_H1 Immunantwort [103, 115] (s. Abb.1.2).

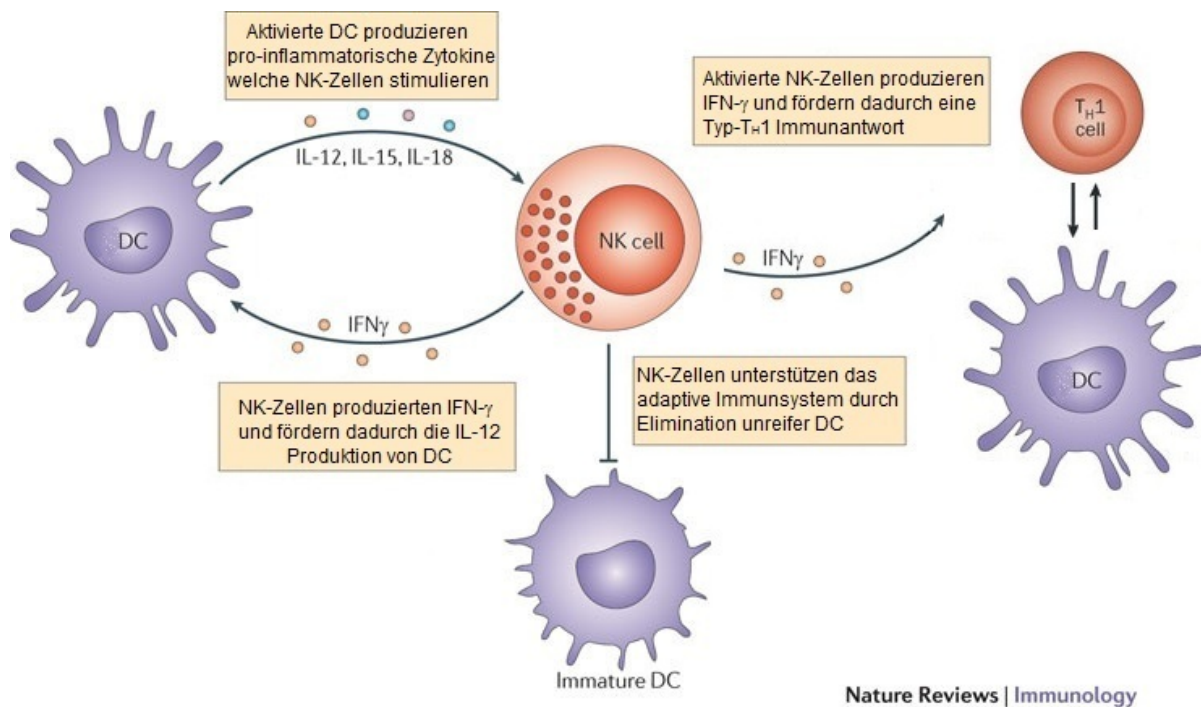


Abb. 1.2 **Die NK-Zelle als Regulator und Initiator.** Von NK-Zellen produziertes IFN- γ fördert die Synthese des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 durch DC, welches wiederum die NK-Zelle stimuliert. Diese bidirektionale Interaktion führt zur Aktivierung beider Zelltypen. Eine Rekrutierung und Aktivierung von NK-Zellen in lymphoide Gewebe liefert somit eine erste Quelle für IFN- γ und induziert dadurch eine Typ-T_H1 Immunantwort. Neben dieser aktivierenden NK-DC Interaktion kann es auch zur Elimination von unreifen DC durch NK-Zellen kommen. Original [5] modifiziert

1.1.1.3. LÖSLICHE KOMPONENTEN

Die löslichen Komponenten der angeborenen Immunantwort beinhalten das Komplementsystem, Zytokine und eine Vielzahl weiterer Mediatoren (z. B. Proteasen, Prostaglandine). Das Komplementsystem besteht aus mindestens 20 verschiedenen Serumglykoproteinen, die unter bestimmten Bedingungen in einer Kaskade aktiviert werden. Die Folgen einer Komplementaktivierung sind komplex, dazu gehören z. B. Opsonierung (Anheftung von Antikörpern und Komplement) von Mikroorganismen als Vorbereitung für die Phagozytose, die Lyse von Fremdzellen, das Anlocken von Immunzellen und die Erhöhung der Gefäßpermeabilität.

Die Funktion der Zytokine ist dagegen die Vermittlung und Regulation des Zusammenspiels der Immunzellen. Zytokine werden definiert als von Zellen freigesetzte Proteine, die das Verhalten von anderen Zellen, die einen spezifischen Rezeptor für sie tragen, beeinflussen. Zytokine sind kleine bis mittelgroße Polypeptide, die hochwirksame biologische Auswirkungen auf viele Zelltypen vermitteln. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der interzellulären Kommunikation und sind essentiell für die Vermittlung und Regulation von immunologischen Reaktionen. Sie werden vorwiegend von Lymphozyten und APZ gebildet, aber auch von nicht immunologischen Zellen wie Endothelzellen und Keratinozyten [83]. Ihre biologische Aktivität ist charakterisiert durch Pleiotropie, d. h. Zytokine haben verschiedenartige Effekte auf eine Vielzahl von Zellen, wobei die Zielzelle entweder die Zelle, die das Zytokin sezerniert (autokrine Wirkung), eine Zelle in der Nähe (parakrine Wirkung) oder eine räumlich weit entfernte Zelle (endokrine Wirkung) sein kann [140]. Weiterhin weisen verschiedene Zytokine gleiche Wirkungen auf, sie sind redundant [141].

Die Regulation der Zytokinsekretion kann auf transkriptioneller Ebene, durch Beeinflussung der Stabilität der entstehenden *messenger ribonucleic acid* (mRNA) oder durch posttranslationale Mechanismen, wie proteolytische Spaltung erfolgen. Die Wirkung von Zytokinen wird durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen vermittelt [19]. Zytokinrezeptoren sind Transmembranproteine, die eine sehr hohe Affinität für ihre Liganden aufweisen. Daraus ergibt sich, dass nur geringe Mengen eines Zytokins zur Entfaltung einer biologischen Wirksamkeit benötigt werden. Die Funktion des Zytokinrezeptors besteht in der Umwandlung eines extrazellulären Signals in ein intrazelluläres Signal, was meistens mit der Transkription neuer Gene verknüpft ist [135].

Zytokine werden nach ihren Effekten während eines Entzündungsprozesses in pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine unterteilt. Zu den Zytokinen, die den Entzündungsprozess stimulieren, gehören z. B. TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), GM-CSF. Zytokine, die eine inhibitorische Wirkung auf die Entzündungsantwort haben, sind z. B. IL-10 und *Transforming growth factor* (TGF- β) [83, 96, 122, 126, 139].

Die angeborene Immunität bildet eine erste schnelle Abwehr. Weiterhin spielt sie eine wesentliche Rolle bei der Steuerung der adaptiven Immunität [83].

1.1.2. DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM

An der adaptiven Immunität sind Lymphozyten, wie auch Antikörper und Zytokine (humorale Immunität) beteiligt. Zu den Lymphozyten gehören die B- und T-Zellen. Jeder T- bzw. B-Lymphozyt trägt an seiner Oberfläche Rezeptoren einer einzigen Spezifität. Werden T- und B-Zellen durch ihr spezifisches Antigen aktiviert, kommt es zur sogenannten klonalen Proliferation. Hierbei wird eine hohe Anzahl von identischen Nachkommen erzeugt, die alle die gleiche Antigenspezifität besitzen und somit den auslösenden Krankheitserreger effektiv eliminieren können. Die Nachkommen differenzieren zu Effektorzellen, die den Schutz gegen Pathogene gezielt vermitteln. Ein Teil dieser Lymphozyten differenziert zu Gedächtniszellen, die bei erneutem Auftreten desselben Krankheitserregers schnell und effizient reagieren können (immunologisches Gedächtnis). Die meisten Immunantworten sind eine Kombination von Mechanismen der angeborenen und adaptiven Immunität, wie z. B. bei der Interaktion zwischen Lymphozyten und Phagozyten. So können APZ ein Antigen präsentieren, das durch T-Zellen erkannt wird. Daraufhin setzen die T-Zellen Zytokine frei, die die Phagozyten aktivieren und veranlassen, dass die inkorporierten Pathogene zerstört werden [83].

Das charakteristische Merkmal der B- und T-Zellen ist ihre Fähigkeit, eine spezifische Immunantwort gegen Antigene zu entwickeln. Antigene sind immunogene Substanzen, die eine Immunantwort auslösen. Ausdifferenzierte B-Zellen, sogenannte Plasmazellen sezernieren als Reaktion auf eine Infektion große Mengen an Antikörpern (Immunglobuline, Ig). Die Bindung des Antikörpers führt zur Neutralisation der Krankheitserreger oder bereitet sie für die Aufnahme und Zerstörung durch Phagozyten vor [83].

T-Zellen spielen eine bedeutende Rolle im adaptiven Immunsystem und organisieren die mikrobielle Abwehr. Die Entwicklung und Differenzierung der T-Zellen findet im Thymus statt, von wo aus naive T-Zellen nach Reifung in die Zirkulation gelangen. Unter den T-Lymphozyten gibt es diverse Untereinheiten. So kennt man heute CD8⁺

T-Zellen, $CD4^+$ und $CD8^+$ Natürliche Killer-T-(NKT-Zellen), sowie $CD4^+$ T-Zellen, die sich weiter unterteilen in T_H1 -, T_H2 -, T_H17 - und regulatorische T-Zellen (Treg) (s. Abb. 1.3). Des Weiteren gibt es gamma delta ($\gamma\delta$) T-Zellen, die noch weitestgehend unerforscht sind und als möglicher Link zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem gelten [77].

$CD8^+$ T-Zellen sind zytotoxische T-Zellen und werden auch zytolytische (CTL) T-Zellen genannt. Ihre Aufgabe ist die Kontrolle und Beseitigung intrazellulärer Pathogene und Tumore. Eine $CD8^+$ T-Zell Antwort auf eine Infektion wird in drei Abschnitte unterteilt: Expansion, Kontraktion, Langzeitgedächtnis [195].

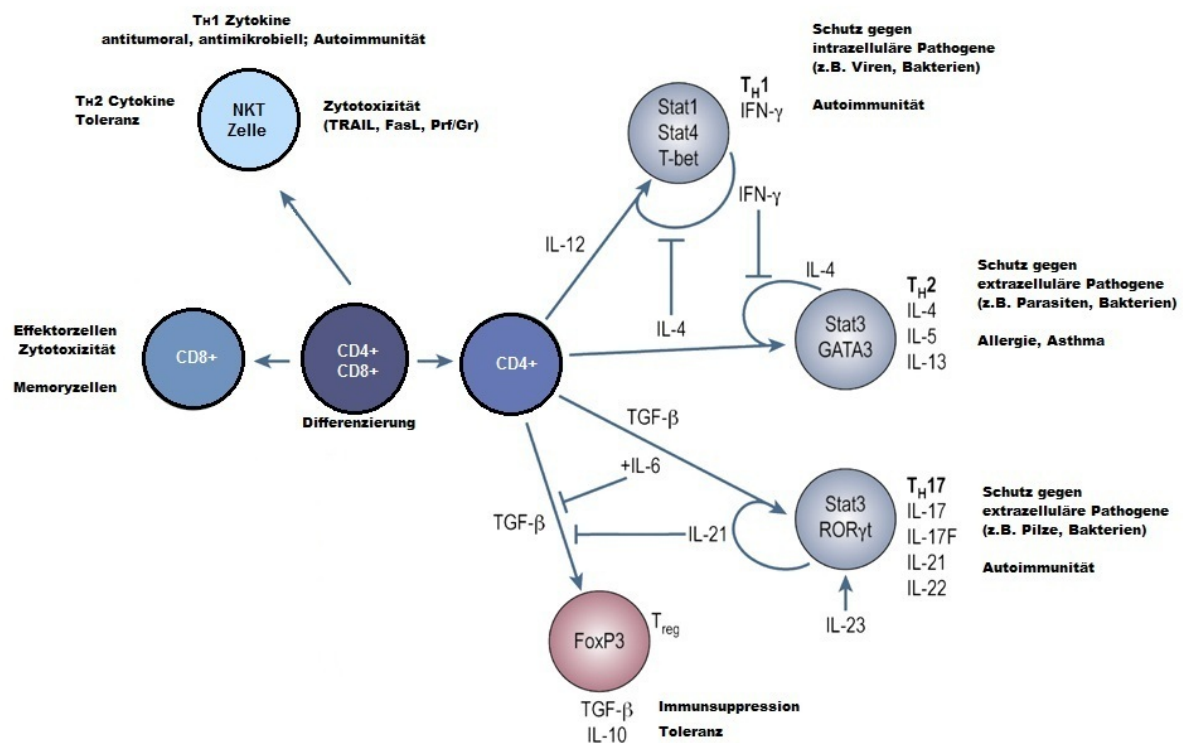


Abb. 1.3 **Schematische Darstellung der T-Lymphozyten Differenzierung.** Im Thymus differenzieren doppelt positive $CD4^+CD8^+$ T-Zellen in $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen, $CD4^+$ T-Zellen und NKT-Zellen. $CD4^+$ T-Zellen können sich dann, in Abhängigkeit des Zytokinsignals, in die Untergruppen T_H1 , T_H2 , T_H17 und regulatorische T-Zellen (Treg) unterteilen. Deren Effektorfunktionen werden im Schaubild verdeutlicht. Original modifiziert [47]

NKT-Zellen sind eine einzigartige Subpopulation von Lymphozyten, welche neben NK-Zell-Markern, wie CD161 und CD94, auch einen T-Zell Rezeptor (TCR) α/β , mit einer eingeschränkten Funktion, exprimieren. Der TCR von NKT Zellen ist dadurch gekennzeichnet, dass er nicht mit MHC Molekülen der Klasse I und II interagieren

kann (s. a. Punkt 1.2). Stattdessen erkennt der TCR Glykolipide über CD1d, welches ein nicht klassisches Antigen-präsentierendes Molekül darstellt [9, 70]. NKT-Zellen unterscheiden sich von herkömmlichen funktional differenzierten α/β TCR tragenden T-Zellen dadurch, dass sie autoreaktiv sind (d. h., sie erkennen eigene Glykolipide) und produzieren sowohl T_H -Antwort Typ 1 (T_H1)- als auch T_H -Antwort Typ 2 (T_H2)-assoziierte Zytokine nach Stimulation mit ihrem Liganden [175]. Mit NKT-Zellen konnte gezeigt werden, dass sie sowohl protektive als auch regulierende Immunfunktionen vermitteln. Dazu gehören Tumorabstoßung, Schutz gegen infektiöse Pathogene, die Aufrechterhaltung der Toleranz eines Transplantats und die Hemmung von Autoimmunerkrankungen [175].

Die größte Diversität findet man unter den $CD4^+$ T-Zellen, welche anhand ihrer Zytokinmuster unterteilt werden. Die letzte Dekade der immunologischen Forschung wurde durch das T_H1 - T_H2 -Paradigma geprägt, welches primär von zwei Formen T-Helfer-Zell-abhängiger Antworten ausging. T_H1 -Antworten, die durch die Produktion von $IFN-\gamma$ gekennzeichnet sind und die Elimination intrazellulärer Erreger steuern und T_H2 -Antworten, die durch das Leitzytokin IL-4 geprägt sind, die Parasitenabwehr unterstützen und zur Antikörpergenerierung beitragen [78, 160]. Seit ein paar Jahren gibt es eine weitere Population, die sich in die Gruppe der Effektorzellen einreicht. Neben T_H1 und T_H2 folgt nun T_H17 . Diese T_H -Zell-Population produziert präferenziell IL-17A. IL-17A ist ein Vertreter der Familie von Zytokinen IL17A-F, die eine Rolle beim Entzündungsprozess, bei Autoimmunkrankheiten und der Abwehr von extrazellulären Pathogenen spielt [78]. Des Weiteren produzieren sie die Zytokine IL-21 und IL-22 mit stark pro-inflammatorischen Effekten [14, 60, 93].

Eine weitere Subpopulation unter den $CD4^+$ Zellen stellen Treg dar, die wie der Name schon sagt, regulierende Funktionen einnehmen. Darunter fallen die Kontrolle von Immunreaktionen und das Verhindern einer überschießenden Entzündung [78, 133]. Grob eingeteilt werden Treg in natürliche und adaptive (induzierte) Treg. Natürlich vorkommende Treg (nTreg) entstehen im Thymus und emigrieren von dort, um ihrer Aufgabe der Immunhomöostase nachzukommen. nTreg sind $CD4^+CD25^+$ und beginnen ihre suppressive Wirkung über die Expression des Transkriptionsfaktors *Forkhead box protein 3* (Foxp3) [64]. Dazu gehören die Sekretion von Zytokinen wie IL-10 und TGF- β , die Zellzyklus-Arrest oder Apoptose in

T-Effektorzellen induzieren können, sowie die Blockierung der Co-Stimulation und Reifung von DC [44]. Induzierte Treg (iTreg) differenzieren in sekundären lymphoiden Organen und Geweben aus CD4⁺ Treg Vorläuferzellen. Die Differenzierung in iTreg findet unter verschiedenen Konditionen statt und führt zur Expression von CD25 und Foxp3 unter dem Einfluss von TGF- β [32]. Sie sind essentiell für die Kontrolle von Allergie (chronische Inflammation), Krebs (Tumor), Diabetes, bei Transplantaten und anderen Immun-vermittelten Erkrankungen. Generell wird das Minimalprogramm für die Entwicklung von Foxp3⁺ iTreg folgend definiert: Es erfordert TCR Stimulation und die Zytokine TGF- β und IL-2, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [44].

1.2. ANTIGENERKENNUNG, ANTIGENPRÄSENTATION UND AKTIVIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN

In den sekundären lymphatischen Organen findet die Antigenerkennung statt. T-Lymphozyten erkennen mithilfe ihres membranständigen TCR spezifische Antigene, die ihnen in Form von prozessierten Peptidfragmenten in Assoziation mit MHC-Molekülen von professionellen APZ präsentiert werden [7]. Die MHC-Moleküle werden im MHC kodiert. Die MHC-Gene des Menschen sind im *human leukocyte antigen*- (HLA), die der Maus im H2-Genlokus kodiert [90]. Sie sind polygen angelegt und unterliegen einem ausgeprägten Polymorphismus. MHC-Klasse-I-Moleküle kommen auf nahezu allen kernhaltigen Zellen des Organismus vor. Sie präsentieren Peptide, die aus dem Zytosol stammen; MHC-Klasse-II Moleküle werden auf DC, Makrophagen, B-Zellen sowie den Thymusepithelzellen exprimiert und präsentieren Peptide von Proteinen, die nach Endozytose die Endolysosomen erreichen und dort prozessiert werden. Die Erkennung von Antigenen führt zur Aktivierung von Phagozyten und der Aufnahme der Partikel, die dann in den Phagozyten abgebaut werden.

Über so genannte PRR (*pathogen* oder *pattern recognition receptors*) können Phagozyten bestimmte Pathogen-typische Strukturen, auch PAMP (*pathogen associated molecular patterns*) bezeichnet, erkennen. Als PAMP werden Zellwandbestandteile von Bakterien, wie Peptidoglycan oder bestimmte nicht methylierte DNA- (*desoxyribonucleic acid*) Sequenzen, die nur bei Bakterien vorkommen (CpG-Oligonukleotide), bezeichnet. Zu den wichtigsten PRR zählen die

Toll-like-Rezeptoren (TLR) [3]. Nach Aufnahme befindet sich das Antigen zuerst in einer endozytotischen Vakuole. Dieses Endosom beinhaltet endosomale Proteasen, die durch den neutralen pH-Wert inaktiv sind. Im Folgenden wird der pH-Wert in den Endosomen sukzessiv verringert. Cathepsin-Proteasen werden in saurem Milieu aktiv und sind neben weiteren Proteasen an der Zerstörung und dem Abbau der Mikroorganismen beteiligt. Zusätzlich zu den Hydrolasen besitzen Makrophagen und Neutrophile weitere Mechanismen, um Mikroorganismen abzubauen. Diese Mechanismen werden in Makrophagen durch Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ induziert. So produzieren aktivierte Makrophagen zur Pathogenabwehr Hyperoxid-Anionen, Hydroxyl-Radikale, Hypochlorsäure und Stickstoffmonoxid, die im Zusammenspiel starke mikrobizide Wirkung besitzen. Außerdem führt die Aktivierung durch $\text{IFN-}\gamma$ zur schnelleren Reifung der Phagolysosomen und damit zum beschleunigten Abbau phagozytierter Mikroorganismen [51, 83, 188].

CD8^+ T-Lymphozyten erkennen in der Regel endogene Peptide, die ihnen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden, während CD4^+ T-Lymphozyten exogene Antigene erkennen, die ihnen über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden. Dabei erkennen T-Lymphozyten ihr spezifisches Peptid nur dann, wenn es ihnen von einem körpereigenen MHC-Molekül präsentiert wird. Dieser Mechanismus wird als MHC-Restriktion bezeichnet [2, 87, 202].

Zur vollständigen Aktivierung naiver T-Lymphozyten werden zwei Signale benötigt. Das primäre Signal ist die Interaktion zwischen TCR, Peptid und MHC-Molekül. Zusätzlich wird noch ein zweites co-stimulatorisches Signal zwischen der T-Zelle und der APZ (z. B. DC) benötigt. Das sekundäre Signal entsteht durch die Interaktion von CD28 des T-Lymphozyten mit B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86), das auf aktivierten APZ exprimiert wird. Als drittes Signal während der T-Zell Aktivierung spielen Zytokine im umgebenen Milieu eine wichtige Rolle, da sie die Polarisierung der T_H -Zellen beeinflussen. So fördert von APZ sezerniertes IL-12 eine $\text{T}_\text{H}1$ -Entwicklung, während IL-10 und IL-4 die Entwicklung einer $\text{T}_\text{H}2$ - Antwort vermitteln (s. Abb.1.4).

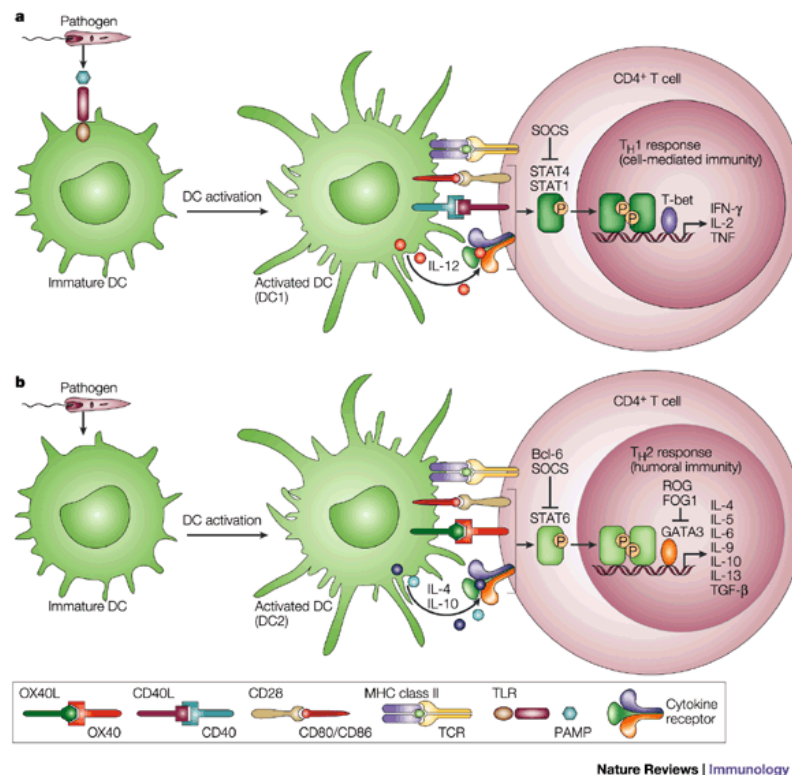


Abb. 1.4 **Modell der T_H1-/ T_H2-Differenzierung.** Sowohl T_H1- und T_H2-Zellen benötigen zur Differenzierung Antigene, die naiven CD4⁺ T-Zellen durch dendritische Zellen (DCs) präsentiert werden. Die Interaktion von co-stimulatorischen Molekülen mit ihren jeweiligen Liganden (CD40-CD40L, OX40-OX40L und/ oder CD80-CTLA4/CD28), zusammen mit dem lokalen Zytokinmilieu, fördert die Differenzierung von naiven T-Zellen in Interferon- γ (IFN- γ)-sezernierende T_H1-Zellen oder Interleukin-4 (IL-4)-sezernierende T_H2-Zellen. Es wird vermutet, dass Subpopulationen von DC, bekannt als DC1 und DC2, existieren, die T_H1- und T_H2-Differenzierung dirigieren können. Original [162]

Die Interaktion zwischen TCR und MHC/Peptid Komplex in Abwesenheit des co-stimulatorischen Signals induziert Anergie oder Apoptose der T-Zelle [22, 35, 153]. Ein weiteres aktivierendes Signal bei der T_H1 Induktion ist die Bindung von CD40Ligand auf den T-Zellen an CD40 auf den DC. Dieses Signal führt zu einer vermehrten CD80 und CD86 Expression auf DC, sowie einer erhöhten Zytokin- (IL-12, TNF- α) und Chemokinproduktion [27, 104]. Die Aktivierung der T-Zelle führt zur verstärkten IL-2-Synthese und Expression des IL-2-Rezeptors. IL-2 wirkt autokrin auf die T-Zelle und stimuliert die Proliferation und Expansion des Antigen-spezifischen T-Zell-Klons (sogenannte klonale Expansion). Auf diese Weise differenzieren naive T-Zellen zu Effektor- und Gedächtniszellen [170]. Nach Polarisierung der T-Helfer-Zelle werden Zytokine sezerniert, die eine T_H1- bzw. T_H2 abhängige Immunantwort induzieren. Die T_H1-Zytokine wirken dabei antagonistisch

gegenüber den T_H2 -Zytokinen und auch anders herum. So hemmt IL-10 die Entwicklung einer T_H1 -Antwort, während $IFN-\gamma$ die Polarisierung in Richtung T_H2 -Zellen verhindert [20, 131, 145].

1.3. TRAUMA: DIE ROLLE DES IMMUNSYSTEMS

Der Begriff Trauma ist vom griechischen Wort τραύμα abgeleitet, welches Verletzung oder Wunde bedeutet. Im medizinischen Sprachgebrauch wird unter einem Trauma die Verletzung eines Körpers durch Gewalteinwirkung von außen verstanden. Speziell wird der Begriff „Trauma“ in der Medizin einerseits im Zusammenhang mit seelischen Störungen verwendet, vor allem aber findet er Verwendung im Zusammenhang mit körperlichen Verletzungen, wie Sturz- und Verkehrsunfall-Verletzungen (stumpfe Traumata), sowie Schuss- und Stich-Verletzungen (penetrierende Traumata) [108]. Traumatische Ereignisse stellen Eingriffe in die körperliche Integrität dar, die zu immunologischen, metabolischen und mikrozirkulatorischen Komplikationen, im schlimmsten Fall mit Todesfolge, führen können.

Die *World Health Organisation* (WHO) schreibt im Jahr 2002, auf Grundlage eines globalen Datensatzes, dass im Jahr 2000 weltweit etwa 5 Mio. Menschen an den Folgen von Verletzungen starben. Diese Zahl entspricht 9% aller Todesfälle [54]. Neuere Daten von 2008 zeigen, dass Verletzungen die dritthäufigste Todesursache in der Europäischen Union (EU) der WHO darstellen. Jedes Jahr versterben in etwa 800000 Menschen aller Altersgruppen (252000 aus der EU) an den Folgen von Unfall- oder Gewalt-bedingten Verletzungen [165].

In das Verletzungsmuster fallen Traumata der Art Schädel-Hirn, Thorax, Fraktur, Weichteil, Verbrennung und hämorrhagischer Schock. Die Verletzungsschwere und deren prognostische Bedeutung für die polytraumatisierten Patienten versucht man anhand einiger *intensive care unit* (ICU)-Punktesysteme (z. B. *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA), *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE) II) quantitativ zu erfassen [123, 148, 203]. Da sich eine einzelne Methode bei verschiedenen Verletzungsmustern als schwierig erwies, wurden mehrere alternative Scoring-Systeme vorgeschlagen, jede mit ihren eigenen Problemen und Einschränkungen [23, 183]. Insgesamt wurde bis heute keine befriedigende Methode

zur Klassifizierung der Verletzungsschwere gefunden. Trotz der Möglichkeit, große Patientengruppen zu beurteilen, scheint eine Einschätzung der individuellen Prognose schwierig [39, 100].

Die Letalität der polytraumatisierten Patienten konnte in den letzten Jahren durch Einführung moderner Rettungssysteme, sowie Fortschritte in Diagnostik und chirurgischer Versorgung gesenkt werden. Die immer erfolgreichere Primärbehandlung führte zu einer Stabilisierung der vitalen Funktionen in der initialen Phase nach dem Trauma. Trotz dieser Fortschritte in der Wundversorgung moduliert Trauma das Immunsystem von Polytrauma-Patienten, deren Konsequenzen zum Tode führen können. Die Trauma-induzierte Immunantwort wird formal unterteilt in eine Phase der Hyperinflammation (*systemic inflammatory response syndrome*, SIRS) und eine parallel auftretende Phase der Regulation, bei der es zur Unterdrückung von verschiedenen zellulären und humoralen Immunfunktionen kommt (*compensatory anti-inflammatory response syndrome*, CARS) [53, 88, 114].

Die als SIRS bekannte Phase der Hyperinflammation ist charakterisiert durch die lokale und systemische Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, Arachidonsäuremetaboliten, Proteinen der Kontakt-Phase der Blutgerinnung, Komplementfaktoren, Akute-Phase-Proteine, sowie hormonelle Mediatoren, wie Adrenalin, Cortisol, Glucagon, u. a. [25]. Es kommt zu Endothelzellschäden, Akkumulation von Leukozyten, zur disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) und Mikrozirkulationsstörungen, die schließlich zur Apoptose und Nekrose von Parenchymzellen führen, mit der Entwicklung des Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) oder des MOF [88]. Des Weiteren kann das Ungleichgewicht zwischen SIRS und CARS zu einem Zustand der Immunparalyse führen, in welchem der Körper unfähig ist eine angemessene Immunreaktion auf eine Infektion zu induzieren. Die regulierende Phase des CARS zeichnet sich durch verstärkte Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine aus. Dazu zählt z. B. IL-10. In diesem Zustand ist der Patient sehr anfällig für Mikroorganismen. Resultierend können Infektionen zu schwerwiegenden Komplikationen, wie Sepsis und septischem Schock mit Organversagen führen [75, 125, 189]. Häufige nosokomiale Pathogene auf Intensivstationen und Auslöser schwerer Infektion sind *Pseudomonas aeruginosa*,

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und *Acinetobacter baumannii* [71, 121, 137, 172].

Neben einer Monozytendeaktivierung, die gekennzeichnet ist durch eine verminderte TNF- α und IL-12 Produktion [129], ist auch eine Unterdrückung der Lymphozyten-Funktion nach Trauma zu beobachten [134]. *Ex vivo* mit Mitogen stimulierte Lymphozyten aus Polytrauma-Patienten zeigen eine verminderte Proliferation und eine reduzierte Fähigkeit IFN- γ zu sezernieren im Vergleich zu Lymphozyten gesunder Probanden. Dagegen sezernieren die Lymphozyten der Patienten vermehrt die T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 [21]. Die Zunahme von anti-inflammatorischen Zytokinen resultiert in der Verschiebung des T_H1/ T_H2 Gleichgewichts in Richtung T_H2. Dadurch kommt es zur Hemmung einer T_H1-Antwort, welche jedoch wichtig für eine Immunität gegen bakterielle Infektionen ist.

1.3.1. MOLEKULARE UND ZELLULÄRE KOMPONENTEN DER IMMUNANTWORT NACH TRAUMA

Eine anfängliche Hypothese für die Ursache der systemischen Entzündungsreaktion nach schwerem Trauma war eine erhöhte Permeabilität des Darms. Es wurde angenommen, dass die systemische Entzündung die Folge einer Translokation von Bakterien aus dem Darm sei [48, 124]. Es konnten jedoch nie bakterielle Bestandteile, wie z. B. LPS, im Serum von Trauma-Patienten nachgewiesen werden, so dass die Annahme einer erhöhten Darmpermeabilität als Ursache der systemischen Entzündung nach Trauma verworfen wurde [124]. Eine heutige Theorie ist, dass körpereigene (endogene) Faktoren nach Gewebeschaden zur Entzündung in Abwesenheit von Mikroorganismen („sterile Entzündung“) führen. MATZINGER beschreibt diese endogenen Alarmsignale, welche durch verletztes oder gestresstes Gewebe freigesetzt werden, erstmalig in ihrem „*Danger model*“ [67, 116]. OPPENHEIM prägte später den bequemen und lehrreichen Begriff „Alarmine“, welcher einigen dieser endogenen Stresssignalen zugeordnet wurde [142, 143]. Einige Merkmale dieser Alarmine wurden von BIANCHI zusammengefasst [15]:

(A) Alarmine sind Moleküle, die unverzüglich nach nicht-programmiertem Zelltod freigegeben werden. (B) Alarmine können auch von Immunzellen, ohne Zelltod, über spezialisierte Sekretions-Systeme sezerniert werden. (C) Alarmine können

angeborene Immunzellen aktivieren und rekrutieren Makrophagen und DC. (D) Alarmine stellen die zelluläre Homöostase durch Förderung der Geweberekonstruktion wieder her (s. a. Abb. 1.5).

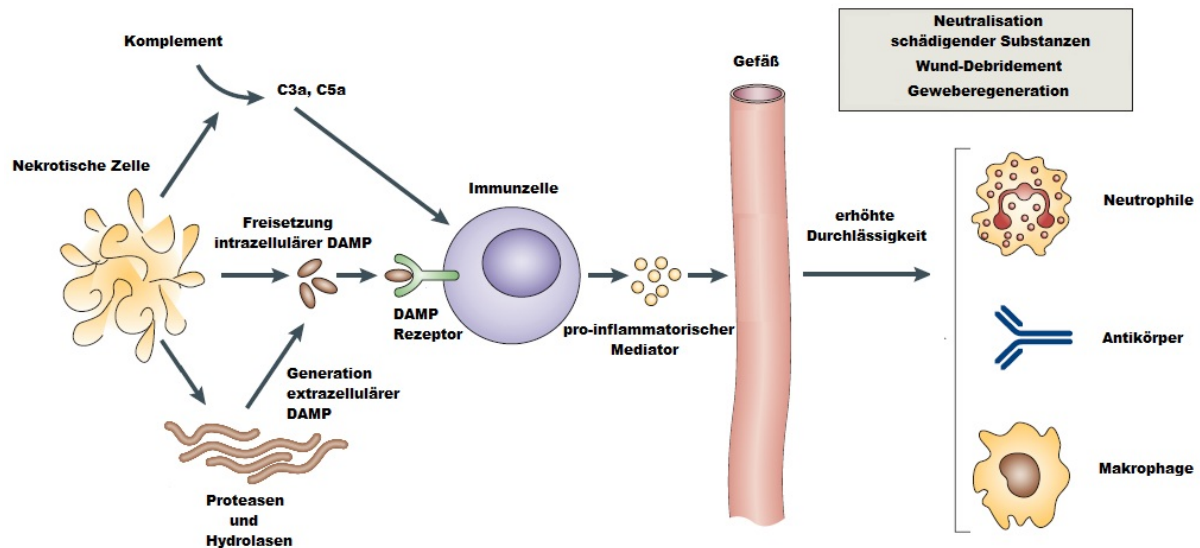


Abb. 1.5 **Zelltod und Inflammation**. Zellen lassen bei Nekrose intrazelluläre damage associated molecular pattern (DAMP) frei, welche von Rezeptoren auf Zellen des Immunsystems erkannt werden, und dadurch eine pro-inflammatorische Antwort induzieren. Andere Moleküle, die von nekrotischen Zellen freigesetzt werden (z. B. Proteasen und Hydrolasen), wirken auf extrazelluläre Komponenten, um Mediatoren (z. B. Komplement-Fragmente) oder DAMP zu erzeugen, welche dann in Zielzellen eine pro-inflammatorische Antwort hervorrufen. Die pro-inflammatorischen Mediatoren wirken auf das lokale vaskuläre Endothel, wodurch es zur erhöhten Gefäßdurchlässigkeit kommt und Neutrophile und Monozyten infiltrieren. Einmal im Gewebe angekommen, lösen diese löslichen (z. B. existierende Antikörper) und zellulären Komponenten Neutralisationsprozesse und Geweberegeneration aus. Original modifiziert [92]

Durch diese Eigenschaften wurden Alarmine und andere endogene Alarmsignale der Familie der DAMP (*damage associated molecular patterns*) zugeordnet [15]. Kandidaten für diese endogenen Alarmsignale sind z. B. intrazelluläre Hitze-Schock-Proteine (HSP), Harnsäure, Ubiquitin, *high mobility group box 1* (HMGB1), extrazelluläres Adenosin-Tri-Phosphat (ATP), mitochondriale DNA und viele weitere [92]. Einige dieser Alarmsignale werden direkt von zellulären Rezeptoren erkannt und induzieren die Generierung von pro-inflammatorischen Mediatoren. Andere fungieren als Alarmsignal, indem sie pro-inflammatorische Mediatoren aus extrazellulären Komponenten generieren, z. B. aus der extrazellulären Matrix oder dem Komplement [157]. HMGB1 z. B. wird von nekrotischen, aber nicht-apoptischen Zellen

freigegeben. Seine acetylierte Form kann aktiv sekretiert werden und stimuliert angeborene Immunzellen, wie Monozyten/ Makrophagen und DC [144]. Für mitochondriale DAMP (formylierte Peptide und mitochondriale DNA) konnte gezeigt werden, dass diese systemisch nach schwerem Trauma freigesetzt werden. Mitochondriale DNA aktiviert dabei Neutrophile, wahrscheinlich über TLR9, und induziert dadurch eine Entzündungsreaktion [200].

Neben einer pro-inflammatorischen Aktivität können Alarmsignale aber auch inhibitorisch wirken. Ubiquitin und HSP70 z. B. hemmen eine LPS-induzierte TNF- α Bildung von Monozyten. Ubiquitin und HSP wurden im Serum von schwer verletzten Patienten nachgewiesen und könnten bei der Entwicklung einer Immunparalyse nach Trauma beteiligt sein [62, 109].

Neben den molekularen Signalen spiegelt auch die Abweichung der zellulären Zusammensetzung (Erhöhung der Granulozytenzahl im Blut, Abnahme der Monozytenzahl) nach Trauma die Veränderungen am Ort des Gewebeschadens wider. Im Rahmen der „sterilen Entzündung“ nach Gewebeschaden kommt es zur Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen zwecks Regeneration. Ebenso erscheinen DC im verletzten Gewebe. Deren Funktion ist jedoch weitestgehend unklar. Neutrophile sind wichtig in der ersten Reaktion auf eine Verletzung, da sie die erste natürliche immunologische Abwehr gegen Mikro-Organismen darstellen und innerhalb von zehn Minuten nach Trauma vor Ort sind. Im Anschluss an die anfänglichen Immunantworten, werden Monozyten und Makrophagen rekrutiert. Diese Zellen instrumentieren die Mechanismen der Wundheilung [49, 50]. Sie funktionieren als Wund-Debridement und sezernieren biologisch aktive Stoffe, so genannte Wachstumsfaktoren (z. B. TGF). TGF spielt eine wichtige Rolle im Zellwachstum und Wiederherstellung von Gewebe und ist somit ein wesentlicher Faktor bei der Wundreparatur nach Trauma [34]. Makrophagen haben einen bleibenden Einfluss auf die späteren Phasen der Proliferation und der Differenzierung des Gewebes. Die Makrophagen im Gewebe differenzieren aus den aus dem Blut rekrutierten Monozyten [68, 174, 196]. Die Aktivierung von Makrophagen findet in der Wunde statt. Im murinen System konnte außerdem gezeigt werden, dass Monozyten nicht nur befähigt sind, in Makrophagen zu

differenzieren, sondern auch in inflammatorische DC, welche $\text{TNF-}\alpha$ und induzierbares Stickstoffoxid produzieren können [164, 196].

Diese Übersicht verdeutlicht die pathophysiologischen Folgen eines Traumas und die Auswirkungen auf das Immunsystem. Das Verständnis dieses komplexen Zusammenspiels multipler Faktoren stellt immer noch eine große Herausforderung für Unfallchirurgen und Forscher in aller Welt dar und ist noch lange nicht vollends aufgeklärt.

1.4. ZIELE DER ARBEIT

Schwerverletzte Patienten oder Patienten, die einer größeren Operation unterzogen wurden, entwickeln nicht nur ein durch Entzündung-induziertes Multiorganversagen, sondern leiden zusätzlich an einem erhöhten Risiko für infektiöse Komplikationen, durch die Entwicklung einer Immunsuppression [6, 173]. Der Ursprung der Verletzung-induzierten Immunsuppression ist weitestgehend unklar, wird aber zum Teil auf eine Dysfunktion der Monozyten und T-Lymphozyten zurückgeführt [36, 99, 118]. Während die Modulation des Immunsystems nach Verletzungen, wie hämorrhagischer Schock, Fraktur oder Verbrennung, in der Vergangenheit intensiv untersucht wurde, ist nur wenig über die Folgen der Verletzungen der Skelettmuskulatur (Weichteiltrauma) bekannt, obwohl diese Art der Verletzung fast immer mit schwerem Unfall oder nach größeren Operationen der Patienten einhergeht [62, 91].

Das Ausmaß der Immunmodulation nach geschlossenem Weichteiltrauma ist weitestgehend unbekannt. Berichte über Schäden der Skelettmuskulatur (Weichteiltrauma) beschreiben größtenteils Verletzungen, die durch Toxine oder Erfrierung induziert wurden, und zur Folge haben, dass Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, DC und myogene Zellen ins regenerierende Gewebe infiltrieren [150, 178, 187]. Granulozyten und Monozyten entfernen im geschädigten Gewebe Zelltrümmer und sind an der Organisation zur Wiederherstellung des intakten Gewebes beteiligt. Im Gegensatz dazu ist die Funktion von DC, die ebenfalls einwandern, im regenerierenden Muskel unklar.

Mit Hilfe eines Mausmodells zur Induktion eines isolierten, stumpfen Weichteiltraumas der Gastrocnemius-Muskeln sollte in der vorliegenden Arbeit die Rolle dieses Weichteiltraumas auf eine mögliche Immunmodulation insbesondere bei der Entstehung der Immunsuppression hin untersucht werden. Dabei sollte der Mechanismus einer Immunmodulation betrachtet werden und mögliche Ziele des angeborenen und adaptiven Immunsystems identifiziert und näher charakterisiert werden. Weiterhin sollte die Interaktion zwischen dem regenerierenden Gewebe (lösliche Mediatoren, infiltrierende Zellen) und dem Immunsystem im Zusammenhang mit einer Immunmodulation näher untersucht werden.

Erkenntnisse aus dieser Arbeit, über die Modulation von Immunantworten nach isoliertem, stumpfem Weichteiltrauma, könnten zum Verständnis der gestörten Immunabwehr nach Trauma beitragen und neue Hinweise liefern, um zukünftig geeignete Therapieansätze der Immunsuppression zu entwickeln.

2. MATERIAL

2.1. VERBRAUCHSMATERIAL

Die Verbrauchsmaterialien, die unter anderem die Zellkulturplatten, Pipetten, PP-Schraubenverschlussröhrchen, Pipettenspitzen, Kanülen, Einmalspritzen, Zellsiebe und Reaktionsgefäße umfassten, wurden von den Firmen Falcon BD (Heidelberg), Becton, Dickinson and Company BD (Heidelberg), STARLAB (Ahrensburg), Greiner bio-one (Frickenhausen), Eppendorf (Hamburg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

2.2. LABOR-GERÄTE

Für die Arbeiten im Labor wurden die unter Tabelle 2.1 aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Auflichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Auflichtmikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
autoMACS [®]	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CO ₂ Inkubator Forma Scientific	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Durchflusszytometer FACSCalibur [®]	Becton, Dickinson and Company (BD), Heidelberg
Dynal MPC-1 [®] Magnet	Dynal [®] , Invitrogen, Carlsbad, USA
Mikroplatten-Absorptionsreader ELx808	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Spectrophotometer DR/2010	HACH LANGE GmbH, Düsseldorf
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Werkbank antair BSK	Bio-Flow Technik, Meckenheim
Zentrifuge Varifuge 3.0RS	Heraeus, München
Zentrifuge BIOFUGE fresco	Heraeus, München
Zentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg

2.3. CHEMIKALIEN

Die hier verwendeten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „zur Analyse“ und, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma Aldrich (Taufkirchen), Promega (Mannheim), Merck (Darmstadt) und Serva Elektrophoresis (Heidelberg) bezogen. Von der Hauseigenen Apotheke wurde Ethanol bezogen.

2.4. PUFFER, LÖSUNGEN, REAGENZIEN UND BAKTERIEN

2.4.1. PUFFER UND LÖSUNGEN

Zum Ansetzen der Puffer und Lösungen (siehe Tabelle 2.2) wurden, soweit nicht anders angegeben, die Chemikalien der unter 2.3 angegebenen Firmen verwendet. Als Lösungsmittel wurde entionisiertes Wasser aus der hauseigenen Anlage, selbst angesetztes PBS (*Phosphat-buffered Saline*) oder Aqua ad iniectionabilia (Braun, Melsungen) verwendet. Das in der Zellkultur und bei der Aufreinigung von Zellen mittels autoMACS eingesetzte PBS wurde von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und besaß einen Endotoxingehalt von ≤ 1 EU/ml. Die Puffer und Lösungen, die Anwendung in der Zellkultur fanden, wurden vor Gebrauch mit einem 0,22 μ m Filter steril filtriert.

Tabelle 2.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung / Bezugsquelle
autoMACS [®] Bindepuffer	2 mM EDTA; 0,5 % v/v FCS (Biochrom) in PBS
autoMACS [®] Cleaning Solution	70 % v/v Ethanol
autoMACS [®] Rinsing Solution	2 mM EDTA in PBS
autoMACS [®] Running Buffer	2 mM EDTA; 0,5 % v/v FCS (Biochrom) in PBS
Blockierlösung (für ELISA)	1 % FCS in PBS
Cellwash [®]	BD Biosciences, Heidelberg
Cytoperm/Cytofix [®]	BD Biosciences, Heidelberg
EDTA	250 mM Stocklösung
ELISA-Waschpuffer	D-PBS + 0,05 % Tween 20
Erythrozyten-Lysepuffer, pH 7	0,15 M NH ₄ Cl; 10 mM KHCO ₃ ; 0,1 mM Na ₂ EDTA*2H ₂ O
Ethanol	100% v/v, Apotheke Universitätsklinikum Essen
D-PBS (für ELISA)	1,5 M NaCl, 26,8 mM KCl, 14,7 mM KH ₂ PO ₄ , 27,1 mM Na ₂ HPO ₄
Physiologische Trypanblaulösung	0,4 %, Sigma-Aldrich
TMB Substrate Reagent Set	BD OptEIA [™] , BD Biosciences, Heidelberg

2.4.2. REAGENZIEN UND STIMULI

Die unter Tabelle 2.3 aufgeführten Reagenzien und Stimuli wurden von den genannten Herstellern bezogen und fanden Anwendung in der Kultivierung und Aufreinigung von Zellen oder wurden *in vivo* in Versuchstiere appliziert.

Tabelle 2.3 Reagenzien und Stimuli

Reagenz	Bezugsquelle
Anti asialo GM1 Antiserum	Wako Chemicals GmbH, Neuss
BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Flex Sets für Mouse IL-4, IL-5, IL-13	BD Biosciences, Heidelberg
Dynabeads® M-450	Dynal®, Invitrogen, Carlsbad, USA
Human/Mouse TGF beta 1 ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, Frankfurt
ELISA DuoSets IL-10, IL-2, IFN-γ	R&D Systems, Wiesbaden
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience, Frankfurt
Liberase Blendzym 2	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Vybrant CFDA SE CellTracerKit	MolecularProbes, Göttingen
Stimulus	Bezugsquelle
Concanavalin A (Con A)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ovalbumin-Peptid (Peptidname: OVA 323-339)	AnaSpec, San Jose, USA
Ovalbumin-Protein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
rekombinanter muriner Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (rmGM-CSF)	R&D Systems, Wiesbaden

2.4.3. BAKTERIEN

Der *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) Bakterienstamm ATCC 27853 wurde von PROF. DR. GULBINS (Universitätsklinikum Essen, Deutschland) zur Verfügung gestellt und fand Verwendung in der intranasalen (i.n.) Infektion von Versuchstieren.

2.5. SEREN UND MEDIEN

2.5.1. SEREN

Das verwendete Fötale Kälber Serum (*Fetal Calf Serum*, FCS) stammte von der Firma Biochrom (Berlin). Es wurde zur Inaktivierung der Komplementkomponenten 30 Min bei 56° C im Wasserbad erhitzt und in 50 ml Portionen bei -20° C aufbewahrt. Der Endotoxingehalt lag bei 1,00 EU/ml. Normales Kaninchenserum wurde aus Kaninchenblut nach Inkubation des Blutes bei Raumtemperatur (RT) und Abschluss der dabei eintretenden Gerinnung durch Zentrifugation gewonnen. Das Kaninchenblut wurde von einem naiven Kaninchen im Zentralen Tierlabor des Uniklinikums Essen ohne Zusatz von Gerinnungshemmern abgenommen. Eine

Hitze-Inaktivierung des Kaninchenserums erfolgte nicht. Das Serum wurde in 500 µl Aliquots bei -20° C aufbewahrt.

2.5.2. ZELLKULTURMEDIUM

Als Kulturmedium diente für alle Arbeiten in der Zellkultur *very low endotoxin medium* (VLE) RPMI 1640 der Firma Biochrom (Berlin). Als endotoxinfreie Zusätze enthielt das Kulturmedium 10 mM HEPES (Biochrom, Berlin), 0,06 mg/ml Penicillin (Sigma Aldrich, Taufkirchen), 0,02 mg/ml Gentamicin (Sigma Aldrich, Taufkirchen) und 0,05 mM β-Mercaptoethanol. L-Glutamin war in dem RPMI Medium in stabiler Form enthalten. Zur Kultivierung wurden dem Kulturmedium 10 % Hitze-inaktiviertes FCS zugesetzt.

2.5.3. MEDIUM FÜR BAKTERIEN

Die Kultivierung des Bakterienstammes *P. aeruginosa* erfolgte auf *Tryptic-Soy-Agar* (TSA)-Platten. Der hierfür verwendete Agar stammte von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und das *tryptic soy broth* (Tryptic-Soja-Bouillon, TSB) wurde von Bacto™ (BD, Heidelberg) bezogen. Für die Herstellung der TSA-Platten wurden 10,5 g TSB und 5,2 g Agar in 350 ml destilliertem H₂O gelöst und für 15 min bei 121°C autoklaviert. Von diesem Ansatz wurden jeweils 10 ml. in sterile Petrischalen gegossen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Für die Anzucht der Bakterien wurde Trypticase™ Soy Agar Medium (BD, Heidelberg) verwendet.

2.6. ANTIKÖRPER

Die in der Tabelle 2.4 aufgelisteten Antikörper dienten der Charakterisierung von Zellen bezüglich ihrer Oberflächen-Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie.

Tabelle 2.4 Antikörper

Spezifität	Konjugation	Klon	Bezugsquelle	Isotyp
CD3		17A2	BD Biosciences, Heidelberg	Arm. Hamster IgG1,κ
CD3	FITC	145-2C11	BD Biosciences, Heidelberg	
CD4	PE	RM4-5	BD Biosciences, Heidelberg	
CD11b	PerCPCy5.5	M1/70	BD Biosciences, Heidelberg	
CD11c	APC	N418	BD Biosciences, Heidelberg	
CD16/CD32 (Fcγ III/II)			BD Biosciences, Heidelberg	
CD25	PECy7	PC61.5	eBioscience, Frankfurt	
CD40	FITC	HM40-3	eBioscience, Frankfurt	
CD49b	APC	DX5	eBioscience, Frankfurt	
CD69	PE	H1.2F3	BD Biosciences, Heidelberg	
CD86	PE	GL1	BD Biosciences, Heidelberg	
CD335	APC		BioLegend, San Diego, USA	
DO11.10 TCR	APC	KJ1-26	eBioscience, Frankfurt	
Foxp3	PE	FJK-16s	eBioscience, Frankfurt	
I-A/I-E	FITC	2G9	BD Biosciences, Heidelberg	
NKG2A/C/E	Biotin		BD Biosciences, Heidelberg	Rat IgG2a, κ
NKG2D	PE		eBioscience, Frankfurt	Rat IgG1, κ
SAV	PerCPCy5.5		BD Biosciences, Heidelberg	

2.6.1. ANTIKÖRPER ZUR ANREICHERUNG VERSCHIEDENER MURINER ZELLTYPEN

Zur Anreicherung von CD3⁺ Zellen wurde der *Pan T Cell Isolation Kit* (αCD45R, αCD49b, αCD11b, αTer-119, Anti-Biotin *MicroBeads*) der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) verwendet. Die Depletion von CD3⁺ Zellen erfolgte durch Verwendung von Antikörper αCD3 Klon 17A2 (s. Tab. 2.4), Dynabeads[®] M-450 Schaf anti-Ratte IgG und einem DynaMag[™] Magnet (Dyna[®], Invitrogen, Carlsbad, USA).

2.7. VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere wurden männliche Mäuse vom Stamm BALB/c verwendet, die von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen wurden, oder aus eigener Zucht stammten. Die Zucht der BALB/c Mäuse im Zentralen Tierlaboratorium (ZTL)

des Universitätsklinikums Essen griff dabei zurück auf Elterntiere, die ursprünglich von Harlan Winkelmann erworben worden waren. Die für *in vivo* Versuche benötigten Antigen-spezifischen T-Zellen wurden aus homozygoten/ heterozygoten männlichen DO11.10 TCR transgenen Mäusen gewonnen. Die T-Zellen aus den DO11.10 transgenen Mäusen exprimieren einen TCR, welcher spezifisch für ein Ovalbumin-Peptid ist, dass von MHC Klasse II Molekülen des Haplotyps d präsentiert wird (s. auch [156]). Ursprünglich wurden diese DO11.10 transgenen Mäuse von The Jackson Laboratory bezogen und dann im ZTL des Universitätsklinikums Essen gezüchtet. Um den Einfluss endogener T-Zellen zu untersuchen wurden RAG-2 knockout (-/-) Mäuse verwendet. Diesen Tieren fehlt das „*recombination activating gene 2*“ (rag2), wodurch sie keine endogenen B-/ T-Zellen besitzen. Erstmals wurden sie von SHINKAI et al. erwähnt (s. auch [168]). Um den Einfluss von endogenem IFN- γ bei der Reifung von Muskel DC zu untersuchen, wurden IFN- γ ^{-/-} Mäuse verwendet. Diesen Tieren fehlt endogenes IFN- γ . Erstmals wurden sie von DALTON et al. erwähnt [45]. Bei Versuchsbeginn hatten alle Tiere ein Alter von zehn bis zwölf Wochen erreicht. Des Weiteren wurden die zugestellten Tiere frühestens eine Woche nach Lieferung in den Versuch aufgenommen, um den Tieren Ruhe nach Transport-bedingtem Stress zu gewähren. Die Versuchstiere wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen im ZTL des Universitätsklinikums Essen gehalten und hatten Zugang zu Standard-Nager-Futter und Wasser ad libitum.

3. METHODEN

3.1. VERSUCHSTIERE

3.1.1. TIER-MODELL ZUR INDUKTION EINES WEICHTEILTRAUMAS BEI DER MAUS

Das hier genutzte Modell stammt im Original von CRISCO *et al.* [40] und wurde in diesem Labor auf die Maus adaptiert und etabliert. Zur Untersuchung der Wirkung eines lokalen Weichteiltraumas bei Mäusen wurde ein Traumamodell verwendet, bei dem ein geschlossenes Trauma ohne Fraktur erzeugt wird. Männliche BALB/c, RAG-2^{-/-} und IFN- γ ^{-/-} Mäuse wurden unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) intramuskulär (i.m.) mit 57,5 mg/ kg Gewicht Ketamin und 6,5 mg/ kg Körpergewicht Xylazin (CEVA, Sante Animal, Düsseldorf) in 0,9 %iger NaCl-Lösung narkotisiert. Die i.m. Injektion erfolgte in einem Volumen von 50 μ l in den rechten Vorderlauf. Das Muskeltrauma wurde auf dem *musculus gastrocnemius* beidseitig durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde ein Stempel auf den *musculus gastrocnemius* aufgesetzt. Ein Gewicht von 20 g wurde aus einer Höhe von 120 cm, geführt in einer Plexiglasröhre, auf den Stempel fallengelassen. Die Energie des Aufpralls des Fallgewichts übertrug sich auf den Stempel und induzierte ein reproduzierbares und lokal begrenztes Weichteiltrauma (s. Abb. 3.1).

Als Negativkontrolle zu den traumatisierten Tieren wurden Versuchstiere wie oben beschrieben narkotisiert aber kein Trauma induziert. Um genügend Lymphknotenzellen (LNC) für die anschließenden Versuche zu erhalten, wurden mindestens drei Mäuse einem Trauma unterzogen und mindestens drei Mäuse dienten als Narkosekontrolle. Nach Behandlung der Tiere verweilten diese noch maximal 10 Tage im ZTL.

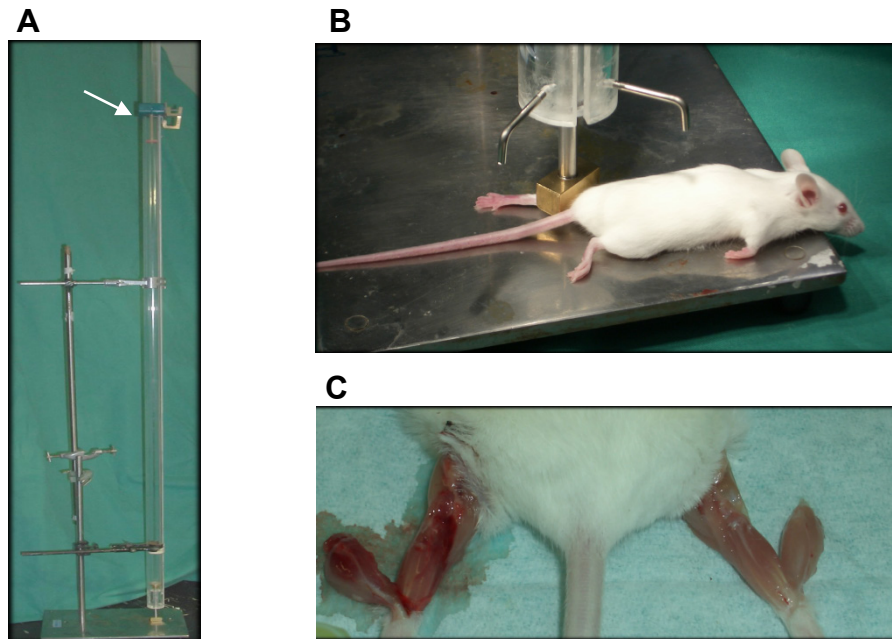


Abb. 3.1 **Applikation eines geschlossenen Weichteiltraumas.** A: Röhre mit eingespanntem Gewicht (s. Pfeil) in 120 cm Höhe. B: Versuchstier mit aufgesetztem Stempel zur Applikation des Traumas. C: Maus in Bauchlage mit anpräparierten Muskeln. Deutlich ist der traumatisierte Muskel links im Vergleich mit dem nicht traumatisierten Muskel rechts erkennbar.

3.1.2. LUNGENINFEKTIONS-MODELL MIT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BEI DER MAUS

3.1.2.1. ANZUCHT DES BAKTERIENSTAMMES *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Einen Tag vor Infektion erfolgte die Anzucht der Bakterien. Dafür wurden Bakterien für 14 h auf TSA Platten (BD™ Trypticase™ Soy Agar, BD, Heidelberg) bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden Erlenmeyerkolben, gefüllt mit 8 ml TSB (Universal-Anreicherungsmedium), mit den Bakterien angeimpft und bei 37°C, im Wasserbad, für eine 1 h kultiviert. Während der logarithmischen Wachstumsphase erfolgte das Ernten der Pseudomonaden durch Überführen in ein 50 ml PP-Röhrchen und Zentrifugation (1300 g, 10 min). Nach Resuspendieren in 20 ml RPMI Medium (Gibco®, Invitrogen, Darmstadt), welches 10 mM Hepes und stabiles L-Glutamin enthielt, wurde die Bakterienzahl mit Hilfe eines Photometers und der Bestimmung der Absorption der Bakterien-Lösung bei 550 nm bestimmt. Bei dem verwendeten Photometer entsprach eine Absorption von 1,0 einer Bakterienzahl von $2,1 \times 10^9/\text{ml}$. Nach zweimaligem Waschen (Zentrifugation und anschließendes Resuspendieren) in

RPML Medium wurden die Bakterien auf die gewünschte Zielzahl durch die Verdünnung mit Medium eingestellt.

3.1.2.2. INFEKTION DER VERSUCHSTIERE MIT *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Für die Infektion von Kontroll- bzw. Trauma-induzierten Versuchstieren des Stammes BALB/c wurden 5×10^8 Kolonie-bildende Einheiten (*Colony-Forming Units*, CFU) i.n. appliziert. Hierfür wurden die Mäuse kurz mit Diethylether narkotisiert und die gewünschte Menge an *P. aeruginosa* wurde in einem Volumen von 20 µl mit Hilfe einer Mikropipette zügig in ein Nasenloch appliziert. Die narkotisierten Versuchstiere wurden während des Eingriffs, bis zur Erlangung des Bewusstseins, in senkrechter Lage positioniert, um die vollständige Aufnahme des Flüssigkeitsvolumens in den Atemtrakt zu gewährleisten.

3.1.2.3. BESTIMMUNG DER BAKTERIELLEN BELADUNG IN DER LUNGE

Vierundzwanzig Stunden nach der Infektion der Versuchstiere mit *P. aeruginosa* wurden die Lungen entnommen (siehe 3.1.8). Mittels eines Duall Homogenisators mit Glaspistill wurden die Lungen in je 1 ml PBS homogenisiert. Zur Bestimmung der Zahl der Bakterien in den Lungen wurden 100µl des Homogenisats für 10 min unter Zugabe von 5 mg/ml Saponin lysiert, um die intrazellulär vorkommenden Bakterien freizusetzen. Durch die Zugabe von 900 µl PBS wurde 1 ml einer 1:10 Verdünnung des Lungenhomogenisates hergestellt, welches zur weiteren seriellen Verdünnung verwendet wurde. Jeweils 900 µl der seriellen Verdünnungen wurden auf TSB-Agar-Platten für 18 h bei 37°C inkubiert und anschließend wurden die CFU ausgezählt.

3.1.3. APPLIKATIONSARTEN

Den Versuchstieren wurden auf unterschiedlichen Applikationswegen Substanzen verabreicht. Dazu zählten Applikationen der Arten i.m., subkutan (s.c.), intravenös

(i.v.), intraperitoneal (i.p.) und i.n.. Als Injektionslösung diente steriles PBS mit geringem Endotoxinwert.

Bei i.m. und s.c. Applikationen wurden je nach Versuch an Tag 1, 4 oder 7 nach Trauma den Versuchstieren Ovalbumin-Protein (OVA, 0,5 mg/ml) im Volumen $3 \times 20 \mu\text{l}$ ($\Sigma 30 \mu\text{g}$ / Bein) i.m. in den *musculus gastrocnemius* oder s.c. im Volumen $30 \mu\text{l}$ / Fuß in die Fußsohle appliziert. Versuche mit OVA-FITC erfolgten nach dem gleichen Prinzip wie mit unkonjugiertem OVA.

Für *in vivo* Versuche mit Knochenmark-gereiften DC (*bone marrow derived dendritic cells*, BMDC) wurden 1×10^5 BMDC in einem Volumen von $1 \times 30 \mu\text{l}$ s.c. in Kontroll- und Traumatiere injiziert.

Bei i.v. Applikationen wurden den Tieren je nach Versuch einen Tag vor der Applikation von OVA 5×10^6 CD3⁺ DO11.10 Zellen teilweise in Kombination mit T-Zellen aus Kontroll- bzw. Traumatieren im Volumen $100 \mu\text{l}$ appliziert.

Um eine immunmodulierende Rolle von NK-Zellen bei der T-Zell-Aktivierung zu untersuchen, wurde den Versuchstieren einen Tag vor Trauma und zwei nach Trauma $50 \mu\text{l}$ Anti asialo GM1 Antiserum i.p. injiziert. Bei dem Anti asialo Serum handelt es sich um ein Serum, das aus Kaninchen gewonnen wird und die Aktivität von NK-Zellen in verschiedenen Ratten- und Maus-Stämmen eliminiert. Das mit Salzen lyophilisiert vorliegende Serum wurde nach den Angaben des Herstellers in 1 ml destillierten Wasser gelöst. Als Kontrolle der Wirkung des Anti asialo Serums wurden auch Kontrollgruppen von Versuchstieren untersucht, denen anstelle des Anti asialo Serums $50 \mu\text{l}$ eines Kaninchenserums (Kontrollserum) i.p. verabreicht wurden.

Eine i.n. Applikation erfolgte nur in Kombination mit dem Bakterium *P. aeruginosa*. Hier erfolgte die Gabe von 5×10^8 Bakterien in einem Volumen von $20 \mu\text{l}$ in das Nasenloch der narkotisierten Maus (s. auch Punkt 3.1.2.2).

3.1.4. ISOLIERUNG VON LYMPHKNOTENZELLEN

Die Isolierung von LNC aus den poplitealen (lat. *poples*, *poplitis* m., Kniekehle) Lymphknoten (LN) der Versuchstiere erfolgte unter der Sterilbank. Für die Isolierung der LNC wurden die Versuchstiere nach Tötung in Rückenlage an den hinteren Extremitäten fixiert und das Fell im Bereich der Hinterbeine mit 70 % Ethanol

desinfiziert. Zur Freilegung der poplitealen LN wurde das Fell auf der Innenseite der Hinterbeine aufgeschnitten und seitlich fixiert. Die LN wurden aus den Kniekehlen präpariert und in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt, in dem sich Kulturmedium befand. Nachdem alle poplitealen LN einer Versuchsgruppe präpariert worden waren, erfolgte die Isolierung der Zellen aus den LN. Dazu wurden die LN mit Hilfe zweier 0,6 x 25 mm Kanülen (BD Microlance™, BD Medical, Heidelberg) in einer Petrischale aufgerissen, in der Medium vorgelegt worden war. Die ausgeschwämmten LNC wurden in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt und auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation (300 g, 10 Min, 4° C) und Aufnahme der Zellen in einer angemessenen Menge an Kulturmedium wurde die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden die Zellen im Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau versetzt, in eine Neubauer-Zählkammer überführt und unter dem Mikroskop gezählt.

Für eine Restimulation wurden die isolierten LNC in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro 200 µl in Triplikaten in 96 well Flachbodenplatten ausgesät und nach einer Stunde Ruhezeit im Inkubator mit 1 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,01 µg/ml Ovalbumin-Peptid (pOVA) in Kulturmedium restimuliert. Des Weiteren wurden die LNC mit 3 µg/ml Concanavalin A (ConA) stimuliert. Bei ConA handelt es sich um ein Metalloprotein aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*), das zur Gruppe der Lektine gehört und Kohlenhydrate binden kann. Es ist in der Lage T-Lymphozyten zu stimulieren und wird auch als Mitogen bezeichnet, da es die Mitoserate der Lymphozyten erhöht. Die Stimulation mit ConA diente als Positivkontrolle, wohingegen Medium alleine als Negativkontrolle diente. Nach drei Tagen wurden die Überstände der LNC-Kulturen abgenommen und für Zytokinquantifizierungen verwendet. Die Triplikate der LNC-Kultur wurden vereinigt und der Aktivierungszustand der T-Zellen wurde, wie bereits beschrieben, mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.1.5. ISOLIERUNG VON MILZZELLEN

Zur Isolierung von Milzzellen wurden die Mäuse durch CO₂-Begasung getötet. Die Tiere wurden auf die rechte Seite gelegt und nach Desinfektion des Fells mit 70 % Ethanol wurde unter sterilen Bedingungen auf der linken Seite im Bereich der Milz ein Hautschnitt vollzogen. Nach Öffnung des Peritoneums wurde die Milz der

Bauchhöhle entnommen. Dazu wurde sie mit Hilfe einer Schere und einer Pinzette vom umliegenden Gewebe getrennt und in eine Petrischale (100 x 15 mm, Falcon, BD Biosciences) überführt, die Kulturmedium enthielt. Um die Zellen aus der Milz zu präparieren, wurde diese in drei Teile geschnitten und durch einen 70 µm Zellfilter in eine Petrischale gerieben. Die Gesamt-Milzzellen (TSC) wurden in der Petrischale in 20 ml Kulturmedium aufgenommen, das 5 mM EDTA enthielt. Das EDTA diente zur Dissoziation vorhandener Zell-Cluster. Im Anschluss wurden die Milzzellen durch einen weiteren kleineren Filter (Ø 40 µm) in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 300 g (1200 rpm) für 10 Min und 4° C konnten die Milzzellen in Kulturmedium aufgenommen werden. Die Zellzahl wurde nach Verdünnung der Zellen im Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die so erhaltenen Milzzellen stammten aus DO11.10 Mäusen und dienten als Quelle zur Anreicherung von OVA-spezifischen T-Zellen.

Des Weiteren wurden Milzzellen aus BALB/c Mäusen gewonnen und für die Anreicherung von APZ verwendet.

3.1.6. ISOLIERUNG VON ZELLEN AUS DEM MUSKEL

Für die Isolierung der Muskelzellen wurde den Tieren nach Tötung durch CO₂-Begasung das Fell im Bereich der Hinterbeine mit 70 % Ethanol desinfiziert. Zur Freilegung und Entnahme des *musculus gastrocnemius* wurde die Haut über den gesamten Bereich der Hinterbeine hinweg aufgeschnitten und von den Beinen getrennt. Mit einer Präparierschere wurde der *musculus gastrocnemius* vom Bein getrennt und in eine Petrischale mit PBS überführt. Anschließend wurde der Muskel so klein wie möglich mit der Schere geschnitten und in ein 15 mm Greinerröhrchen mit 1 ml Liberase Blendzyme 2 (4 µg/ml) überführt. Nach einer Stunde Verdau im Wasserbad bei 37° C wurden die Muskelstücke erst durch ein 40 µm Zellsieb gerieben und die gewonnene Zellsuspension wurde nach Waschen und Zentrifugation bei 460 g (1500 rpm) für 6 Min und 4° C durch einen weiteren Filter mit Maschenstärke 30 µm (MACS Pre-Seperation Filter, Miltenyi Biotec) getropft, um den Debris in der Zellsuspension zu begrenzen. Die Zellen aus dem Muskelverdau wurden nach weiterem Waschen und Zentrifugation bei 460 g (1500 rpm) für 6 Min

und 4° C in geeigneter Menge PBS aufgenommen und für durchflusszytometrische Versuche gefärbt.

3.1.7. ISOLIERUNG VON KNOCHENMARKZELLEN UND DIFFERENZIERUNG VON DC

Zur Generierung von DC aus dem Knochenmark wurden die Zellen aus dem Knochenmark von gesunden männlichen, sieben bis zwölf Wochen alten BALB/c Mäusen isoliert. Die Präparation der Ober- und Unterschenkelknochen aus den Versuchstieren erfolgte unter nicht-sterilen Bedingungen außerhalb einer Sterilbank. Für die Präparation von Femur- und Tibia-Knochen wurden die Versuchstiere der einzelnen Versuchsgruppen durch CO₂-Begasung getötet. Nach Desinfektion des Fells mit 70 % Ethanol wurden mit Hilfe einer Schere die Hinterläufe vom Fell freigelegt. Durch einen Schnitt im Hüftbereich wurden anschließend die Hinterbeine aus den Hüftgelenken gelöst und separiert. Um Femur- und Tibia-Knochen frei zu präparieren, wurden diese Knochen mit Hilfe eines Skalpells voneinander im Kniebereich getrennt. Des Weiteren wurden die Fußknochen von den Femur-Knochen abgetrennt. Die so vereinzelteten Ober- und Unterschenkelknochen wurden mit einem Skalpell von Muskel- und Sehngewebe befreit und bis zur weiteren Verarbeitung in PBS auf Eis gehalten. Alle weiteren Schritte zur Isolierung der Zellen aus den Knochen wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Dazu wurden innerhalb einer Sterilbank die frei präparierten Knochen zunächst zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in sterilem PBS aufgenommen. Die Knochenenden wurden mit einer Schere abgeschnitten und das Knochenmark mit Hilfe von Kulturmedium, das durch eine 27-Gauge Kanüle (BD Microlance™, BD Medical, Heidelberg) in die Knochen gespritzt wurde, aus den Knochen gespült und in einer Petrischale aufgefangen. Die so gewonnenen Knochenmarkzellen (BMC) wurden vorsichtig gemischt, um die Zellen zu vereinzeln. Nach der Überführung der Zellen in ein 50 ml Greinerröhrchen, folgte eine Lyse der Erythrozyten. Dazu wurden die BMC bei 300 g für 10 Min und 4° C zentrifugiert, anschließend in Erythrozyten-Lyse-Puffer (500 µl / Milz) aufgenommen, für 1 Min inkubiert, mit 5 ml Kulturmedium versehen und dann mit 1,5 ml FCS unterschichtet. Zum Abschluss der Erythrozyten-Lyse folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (300 g, 10 Min, 4° C) in dessen

Anschluss die Zellen in Kulturmedium aufgenommen wurden. Die Zellzahl wurde nach einer 1:10 Verdünnung der Zellen mit Trypanblau mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Für die Kultivierung der BMC wurden diese in Petrischalen (100 x 15 mm, Falcon, BD Biosciences) in einer Dichte von 2×10^6 in 10 ml Kulturmedium, das 20 ng/ml murines rekombinantes GM-CSF enthielt, ausgesät. Die Inkubation der BMC erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre (95 %) bei 5 % CO₂ und 37° C im Brutschrank. Nach drei Tagen Kultur wurden 10 ml Kulturmedium, welches 20 ng/ml GM-CSF enthielt, zu jeder Petrischale zugefügt. Am siebten Tag der Kultur wurden alle nicht-adhärenenten Zellen geerntet, abzentrifugiert und gezählt. Bevor die Zellen für weitere Kulturen eingesetzt wurden, wurde die Zahl der ausgereiften BMDC mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt.

Für *in vivo* Versuche wurden die ausgereiften BMDC für 1 h in einer Dichte von 5×10^6 Zellen in einer 6 well-Flachbodenplatte in einem Volumen von 2 ml ausgesät und mit 100 µg/ml Ovalbumin-Protein stimuliert. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden danach geerntet und gezählt. Anschließend wurden 1×10^5 BMDC in einem Volumen von 1 x 30 µl s.c. in Kontroll- und Trauma-Tiere injiziert (s. Punkt 4.3).

3.1.8. ENTNAHME DER LUNGE

Zur Entnahme der Lunge wurden die Versuchstiere in Rückenlage fixiert. Nach der Desinfektion mit 70% Ethanol wurde das Fell auf der Bauchseite mittels einer Schere auf der kompletten Körperlänge aufgeschnitten. Im Anschluss an die Freilegung des Thorax (Brustkorb) wurde die Brusthöhle durch das Durchschneiden des Zwerchfells und Entfernung der Rippen und des Brustbeins eröffnet. Die Lungenflügel wurden mit Hilfe einer Schere und stumpfen Pinzette vorsichtig von der Trachea und der Lungenarterie und -vene getrennt, aus dem Brustkorb entnommen und sofort mit einem Duall Homogenisator mit Glaspistill in 1 ml PBS homogenisiert (s.a. 3.1.2.3).

3.2. KOMMERZIELLE STANDARDTESTVERFAHREN

3.2.1. ANREICHERUNG VON MURINEN ZELLTYPEN MITTELS MACS

Die magnetische Sortierung von murinen Zellen diente dazu, Zellen aus der Milz und den LN anzureichern. Um die Zellen zu separieren, wurde zum einen ein autoMACS™® Gerät und die entsprechenden Isolierungs-Kits der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) verwendet, sowie ein Handmagnet (DynaL MPC-1®, Dynal®, Oslo, Norwegen) zur manuellen Aufreinigung.

3.2.1.1. PRINZIP

Mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (engl.: *Magnetic-Activated Cell Sorting*, MACS) können Zellen aus komplexen Zellgemischen mit hoher Reinheit für weitere Untersuchungen isoliert werden. Bei diesem System werden mit superparamagnetischen Mikropartikeln (ca. 50 nm Durchmesser) konjugierte Antikörper (MACS *MicroBeads*) verwendet. Die gewünschten Zellen werden durch spezifische Antikörperbindung mit den *MicroBeads* markiert und auf eine spezielle Trennsäule gegeben, die mit Stahlwolle oder Stahlkugeln gefüllt ist (s. Abb. 3.2).



Abb. 3.2 **Prinzip der positiven Selektion des magnetic associated cell sorting (MACS).** Die zu isolierenden Zellen werden mittels magnetischer *MicroBeads* gekennzeichnet und über eine Säule getrennt. Während die Säule von einem magnetischen Feld umgeben ist, werden die magnetisch gekennzeichneten Zellen zurückgehalten und nach Entnehmen der Säule aus dem Magnetfeld können die Zellen eluiert werden (Miltenyi Biotec, 2011, modifiziert).

Die Trennsäule befindet sich zwischen den Magnetpolen eines Hochleistungsmagneten. Zwischen den Stahlkugeln entsteht ein Hochgradienten-

Magnetfeld, so dass die markierten Zellen in der Säule zurückgehalten werden, während die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen und als negative Fraktion aufgefangen werden. Die markierten Zellen lassen sich durch Ausspülen der Säule außerhalb des Magnetfeldes gewinnen (Elution). Das MACS-System kann zur Anreicherung (positive Selektion) oder zur Depletion (negative Selektion) von Zellpopulationen verwendet werden.

3.2.1.2. ISOLATION VON CD3⁺ T-ZELLEN AUS DEN LYMPHKNOTEN

Die CD3⁺ T-Zellen aus den Zellsuspensionen von LN wurden unter Verwendung des *Pan T Cell Isolation Kits* nach den Angaben des Herstellers gewonnen. Es werden dabei alle Zellen mit magnetischen *Beads* versehen, die nicht positiv für den Oberflächenmarker CD3 sind, so dass die CD3⁺ T-Zellen nach der Aufreinigung keine magnetischen *Beads* tragen. Für die indirekte magnetische Kennzeichnung aller B-Zellen, NK-Zellen, DC, Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten wurden mit Biotin konjugierte Antikörper gegen CD45R, CD49b, CD11b und Ter-119, sowie Anti-Biotin *MicroBeads* verwendet. Um die CD3⁺ T-Zellen aus den Zellsuspensionen von LN zu isolieren, wurde die benötigte Anzahl an Zellen nach einer Zentrifugation (300 g, 10 Min, 4° C) in 40 µl pro 10⁷ Zellen autoMACS[®] Bindepuffer aufgenommen. Der Biotin-Antikörper-Cocktail wurde in einem Volumen von 10 µl pro 10⁷ Zellen hinzugefügt und nach Mischen erfolgte eine Inkubation von 10 Min bei 4° C. Anschließend wurden pro 10⁷ Zellen 30 µl Bindepuffer und 20 µl der Anti-Biotin *MicroBeads* zugefügt. Die Inkubationszeit für das Binden der *MicroBeads* an die biotinylierten Antikörper betrug 15 Min und erfolgte bei 4° C. Zur Elimination nicht-gebundener Antikörper und *Beads* wurden anschließend 5 ml des autoMACS[®] Bindepuffers zugefügt und die Zellsuspension wurde wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Bindepuffer pro 10⁸ Zellen aufgenommen. Für die Depletion der magnetisch markierten Zellen mit Hilfe des autoMACS[®] wurde das Programm „*Deplete*“ gewählt und die negative Fraktion, die die CD3⁺ T-Zellen enthielt, wurde gesammelt. Nach einer Zentrifugation wurden die Zellen in Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

3.2.1.3. GEWINNUNG VON APZ AUS DER MILZ

Das Prinzip in dieser Aufreinigung liegt darin, dass die mit Dynabeads[®] markierten Zellen in einem magnetischen Feld an die Wand des Reaktionsgefäßes gepresst werden. Die unmarkierten Zellen können dann mit einer Pipette abgenommen werden. Dynabeads[®] sind einzelne superparamagnetische Polymerkugeln. Das superparamagnetische Material ist in den *Beads* gleichmäßig verteilt und wird von einer Polymerschicht eingeschlossen. Die Polymerhülle stellt eine spezifische und definierte Oberfläche für eine Adsorption oder Kopplung von verschiedenen bioreaktiven Molekülen (Liganden) dar.

Die Depletion von CD3⁺ Zellen aus der Milz, zwecks Gewinnung von APZ, erfolgte durch Verwendung von Antikörper α CD3 (BD Bioscience) und Dynabeads[®] M-450 Schaf anti-Ratte IgG (Dyna[®], Invitrogen, Carlsbad, USA) im 5 ml Rundboden Greinerröhrchen unter Nutzung des CD3⁺ Depletionspuffer. Dazu wurde der Zellsuspension 1,5 μ l α CD3 Antikörper pro 1×10^6 erwarteter Zellen nach Depletion hinzugefügt und für 20 Min bei 4° C inkubiert. Im Anschluss wurde mit CD3⁺ Depletionspuffer gewaschen und in 1 ml pro 1×10^7 Zellen resuspendiert. Der Zellsuspension wurden 50 μ l Dynabeads[®] pro 1×10^7 Zellen hinzugefügt und für 30 Min bei 4° C auf einem Rotatoren inkubiert. Um die unspezifische Depletion nicht gebundener Zellen zu limitieren wurden weitere 200 μ l Puffer zugegeben und das Röhrchen wurde dann für 2 Min an einen Magneten (Dyna MPC-1[®]) gestellt. Die markierten Zellen sammelten sich an der Gefäßwand und der Überstand mit den unmarkierten Zellen wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein neues 5 ml Rundboden Greinerröhrchen überführt. Um eine höhere Reinheit zu erzielen wurde ein weiteres Mal mit CD3⁺ Depletionspuffer gefüllt und der Vorgang wiederholt. Nach einer Zentrifugation wurden die Zellen in Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Die so gewonnenen APZ wurden vor dem Aussähen mit einer Einzeldosis von 5 Gray (Gy) im Institut für Medizinische Strahlenbiologie nach Anleitung von PROF. DR. ILIAKIS bestrahlt. Dadurch wurde eine reproduktive Inaktivierung bewirkt.

3.2.2. BESTIMMUNG DER PROLIFERATION MITTELS CELL TRACER KIT

Um die Proliferation einzelner Zellpopulationen bestimmen zu können, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE) verwendet.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass das eigentliche farblose Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidylester (CFDA SE) von den Zellen aufgenommen wird und durch zelleigene Esterasen in die fluoreszierende Form CFSE überführt wird, die über Aminogruppen kovalente Bindung mit endogenen Proteinen eingehen kann und so die Zelle anfärbt (s. Abb. 3.3).

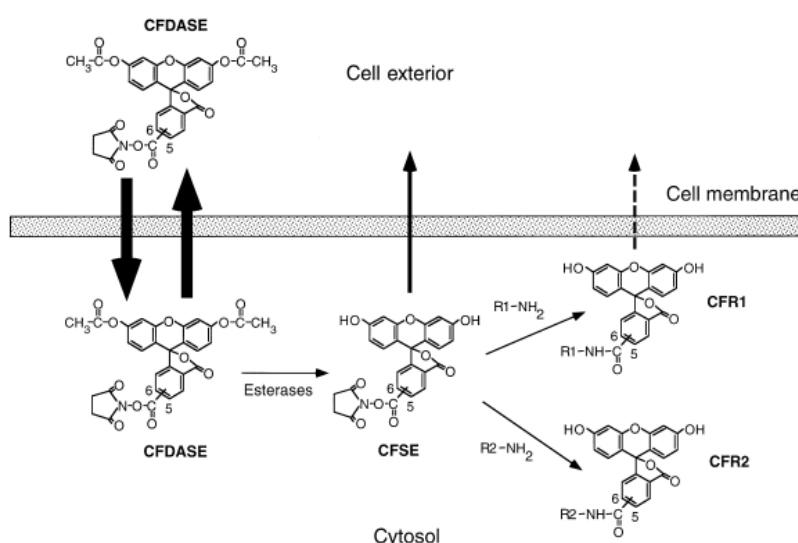


Abb. 3.3 Schematische Darstellung des Mechanismus der CFSE-Markierung von Zellen. Das nicht-fluoreszente 5-(6) Carboxyfluorescein Diacetat-Succinimidylester (CFDA SE) durchdringt aufgrund seiner hohen Lipophilität die Zellmembran. Intrazelluläre Esterasen können zwei Acetat-Gruppen vom CFDA SE abspalten und so das fluoreszente 5-(6) Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE) entstehen lassen, welches weniger membrangängig ist. Der Succinimidyl-Rest des CFSE ist stark reaktiv mit Aminogruppen und kann das 5-(6) Carboxyfluorescein (CF) kovalent mit intrazellulären Molekülen verbinden. Ein Teil dieser Verbindungen kann schnell wieder abgebaut werden oder membrangängig sein (CFR1). Ein anderer Teil der entstehenden Konjugate ist langlebig und nicht in der Lage, die Zellen zu verlassen, so dass eine stabile Fluoreszenz-Markierung entsteht [146].

Teilt sich eine solche Zelle, verteilt sie rund 50 % ihrer (markierten) Proteine auf ihre Tochterzellen und dadurch auch die Hälfte der Gesamtfluoreszenz. Zellen, die sich noch nicht geteilt haben, lassen sich deshalb durchflusszytometrisch anhand von einem klar getrennten *Peak* von solchen unterscheiden, die bereits eine oder mehrere Mitosen durchgeführt haben

Um die Zellen vor der *in vivo* Untersuchung zu markieren und die Proliferation zu analysieren, wurde das Vybrant CFDA SE *CellTracerKit* verwendet. Für die CFSE-Färbung wurden die isolierten Zellen zunächst in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt, zentrifugiert (460 g, 6 Min, 4° C) und in 1 ml vorgewärmtem PBS pro $10 - 15 \times 10^6$ Zellen aufgenommen. Zu den Zellen wurden anschließend 0,5 μ M CFDA SE (*in vitro*) oder 1,5 μ M CFDA SE (*in vivo*) pro $10 - 15 \times 10^6$ Zellen zugefügt. Entnommen wurde das CFDA SE aus einer 10 mM Stock-Lösung, welche im Verhältnis 1:100 in PBS verdünnt wurde. Für die Herstellung der 10 mM CFDA SE Stock-Lösung musste die dem *Kit* zugehörige CFDA SE-Lösung im Verhältnis 1:10 mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (im Lieferumfang enthalten) verdünnt werden. Nach sorgfältigem Mischen der Zellen im 15 ml Greinerröhrchen mit der entsprechenden Menge an CFDA SE folgte eine Inkubation der Zellen für 12 Min bei 37° C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (300 g, 10 Min, 4° C) und das Zellpellet wurde in 1 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden erneut für 30 Min bei 37° C im Wasserbad inkubiert, um das CFSE in der Zelle zu fixieren und überschüssiges CFSE zu lösen. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation (300 g, 10 Min, 4° C) der Zellen, welche im Anschluss daran in geeigneter Menge Medium aufgenommen und gezählt wurden.

3.2.3. ANALYSE VON ZELLEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Bei Kontakt mit einer Zelle führt ein Lichtstrahl zur Entstehung von optischen Signalen unterschiedlicher Qualität. Die Messung der Lichtstreuung und der Fluoreszenz ermöglicht im Rahmen der lasergestützten Durchflusszytometrie die Differenzierung verschiedener zellulärer Parameter. Der Begriff „FACS®“ bedeutet *Fluorescence Activated Cell Sorting*, ist eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson und verweist auf die Fähigkeit des Verfahrens Zellen zu separieren. Die Analyse von Zellen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit einem FACSCalibur® der Firma BD Biosciences (Heidelberg), welches entgegen der Bezeichnung „FACS®“ nicht zur Sortierung von Zellen fähig war, sondern verwendet wurde, um Moleküle auf der Oberfläche oder im Inneren von Zellen mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern quantitativ zu bestimmen.

3.2.3.1. PRINZIP

Die Durchflussszytometrie ist eine Technologie, die zur Charakterisierung von gefärbten Einzelzellen/ Partikeln (mit einer Größe von 0,2 – 150 μm) in Suspensionen genutzt wird. Hierbei ist eine simultane Analyse der relativen Zellgröße, der Granularität, sowie verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe möglich. Um dies zu gewährleisten, besteht ein Durchflussszytometer aus den drei Hauptkomponenten Flüssigkeitssystem, Optik und Elektronik, welche folgendermaßen miteinander verknüpft sind: Die zu untersuchende Zellsuspension wird in einer Trägerflüssigkeit mittels Überdruck in den Messbereich eingebracht. Hier tritt sie in eine Messküvette ein, die abhängig vom Gerätetyp von 1 - 2 bzw. 3 - 4 Lasern durchstrahlt wird, wobei die Zellen jeweils einzeln den Laserstrahl passieren. Hierbei streuen die Zellen das auftreffende Licht, wobei die daraufhin austretenden Streulicht- und Fluoreszenzsignale der Zellen durch Spiegel und Filtersysteme zu den Detektoren des elektronischen Systems geleitet werden. Die Fähigkeit eines Partikels, Licht zu streuen, hängt dabei von seinen physikalischen Parametern wie Größe, interne Komplexität, Zellform und Oberflächenbeschaffenheit ab. Die Intensität der nun generierten elektronischen Signale ist proportional zu den auftreffenden optischen Signalen. Das elektronische System wandelt die Lichtsignale zunächst in elektronische und dann in digitale Signale um, die letztendlich im Computer gespeichert und bearbeitet werden können. Zunächst wird das von den Zellen/ Partikeln gestreute Licht in Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht unterteilt. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC, 2 - 10° zum einfallenden Licht) läuft proportional zur Zelloberfläche und erlaubt eine Aussage über die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC, 90° zum einfallenden Licht) hingegen gibt Auskunft über die relative Granularität oder interne Komplexität der Zelle. (s. Abb. 3.4).

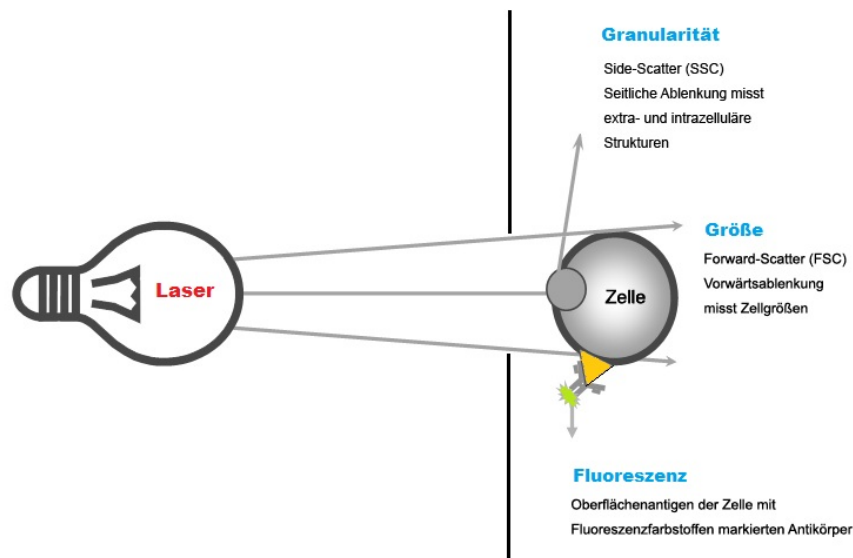


Abb. 3.4 Lichtstreuungs-Eigenschaften einer Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) ist eine Bemessung des Lichtes, das von extra- und intrazellulären Strukturen der Zelle gebrochen und reflektiert wird. Es wird in einem ca. 90° Winkel zum Laserstrahl von einer Sammellinse erfasst und zum entsprechenden SSC-Detektor weitergeleitet. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) ist das Licht, welches aufgrund der Größe der Zellen gebeugt wird. Es wird in Richtung des einfallenden Laserstrahls von einer Fotodiode erfasst und ist proportional zur Zellgröße. Fluoreszenzfarbstoffe welche an der Zelle gebunden sind werden von Lasern erfasst und die Emission des Farbstoffes ermittelt (DRK Blutspendedienst West, modifiziert)

Neben der Lichtstreuung misst das Durchflusszytometer auch die spezifische Fluoreszenz und die entsprechende Fluoreszenzintensität. Zu diesem Zweck stehen Systeme aus Bandpassfiltern und Fotoröhren zur Verfügung, in der Regel für 530 nm (Fluoreszenzkanal FL 1), 585 nm (FL 2), 670 nm (FL 3) und 661 nm (FL 4). Dabei ist die Fluoreszenzintensität 1 (FL 1) proportional zur Intensität der Anfärbung mit FITC. FITC hat ein Absorptionsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 519 nm. Die Fluoreszenzintensität 2 (FL 2) ist proportional zur Intensität der Anfärbung einer Zelle mit PE, wobei in diesem Fall die Absorptionsmaxima bei 488 und 565 nm und das Emissionsmaximum bei 578 nm liegt. Proportional zur Anfärbung einer Zelle mit PerCP verhält sich die Fluoreszenzintensität 3 (FL 3). Das Absorptionsmaximum liegt hier bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 695 nm. Schließlich wird noch die Fluoreszenzintensität 4 (FL 4) gemessen, die sich proportional zur Anfärbung einer Zelle mit APC verhält. APC wird bei 650 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum von 660 nm. Zur Charakterisierung von Zellen im Durchflusszytometer setzt man Antikörper ein, die spezifische Oberflächenmoleküle erkennen und mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt sind. Die Anzahl der im Durchflusszytometer detektierten Fluoreszenzsignale ist

dabei proportional zur Anzahl der Fluorochrommoleküle, die durch Antikörper auf der Zelle bzw. dem Partikel gebunden sind. Extrazelluläre Färbungen detektieren Epitope auf der Zelloberfläche, während nach Permeabilisierung der Zellmembran andere Antikörper spezifische Bestandteile im Zellinneren erkennen. Diese Methode wird folglich als intrazelluläre Färbung bezeichnet. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen und zum Einstellen der Parameter am Durchflusszytometer dienen Isotypkontrollen. Hierbei kommen Antikörper des gleichen Ig-Isotyps zum Einsatz, die mit demselben Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, aber kein spezifisches Epitop erkennen.

3.2.3.2. FÄRBUNGEN VON ZELLOBERFLÄCHENMOLEKÜLEN

Für die Oberflächenfärbung von Molekülen auf Zellen wurden jeweils 1×10^6 Zellen in eine 96-well Rundbodenplatte transferiert und bei 460 g (1500 rpm) und 4° C für 6 Min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet auf dem Schüttler gelöst. Um unspezifische Bindung des Antikörpers zu inhibieren, wurde das Pellet in 50 µl Cellwash mit 5 µl einer 1mg/ml Maus IgG-Lösung resuspendiert (Blocken). Die Inkubationszeit des Blockens betrug 6 Min und wurde bei 4° C unter Lichtausschluss durchgeführt. Durch Zugabe der entsprechenden Mengen an Antikörpern erfolgte die Färbung der spezifischen Oberflächenmoleküle. Zugegeben wurde je nach Färbung ein Gemisch aus Antikörpern in 50 µl Cellwash. Nach einer Inkubationszeit von 15 Min bei 4° C im Dunkeln wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl Cellwash gewaschen und bei 460 g (1500 rpm) für 6 Min und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wieder gelöst und in 200 µl Cellwash aufgenommen. Bei den Färbungen mit einem biotinylierter Antikörper erfolgte nach Inkubation der Zellen mit dem ersten biotinylierten Antikörper ein weiterer Inkubations- und zusätzlicher Waschschrift (für 10 Min bei 4° C im Dunkeln) mit PerCPCy5.5-konjugiertem Streptavidin, das an Biotin bindet.

Die Messung der gefärbten Zellen erfolgte mit einem FACSCalibur® nach Transfer der Zellen in ein 5 ml Rundbodenröhrchen, in denen 50 µl Cellwash vorgelegt wurde.

3.2.3.3. INTRAZELLULÄRE FÄRBUNGEN

Zum Nachweis von intrazellulärem Foxp3 wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung einmal in Cellwash gewaschen, bei 460 g (1500 rpm) für 6 Min

und 4° C zentrifugiert und anschließend nach dem Protokoll des Herstellers des *Foxp3-Staining Sets* (*Foxp3 Staining Set*, eBioscience, San Diego, USA) fixiert und permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen mit dem entsprechenden PermWashPuffer wurden die Zellen mit 100 µl PermWash-Puffer mit 0,5 µl Foxp3-Antikörper für etwa 45 Min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PermWash-Puffer und einmal mit Cellwash gewaschen (460 g; 6 Min), in einem Volumen von 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und in Rundbodenröhrchen überführt. Die Messung und Auswertung erfolgte wie auch bei der Färbung der Oberflächen-Moleküle mit Hilfe eines FACSCalibur® und mit der Software Cell Quest Pro.

3.2.4. ZYTOKINNACHWEIS MITTELS CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA)

Der *Cytometric Bead Array* (CBA) wurde nach Herstellerangaben verwendet, um mehrere Zytokine gleichzeitig in einem geringen Volumen an Zellkulturüberständen zu detektieren. Hierfür wurden 25 µl der zu untersuchenden Zellkulturüberstände oder eines im Lieferumfang des Test-Kits enthaltenen Standards in 96 *well*-Rundbodenplatten zunächst für 1 h mit 25 µl einer Mischung aus verschiedenen *MicroBeads* inkubiert. Die *MicroBeads* (oder *CaptureBeads*) besitzen eine definierte Fluoreszenz-Intensität und sind mit einem *Capture*-Antikörper gekoppelt, der spezifisch für ein einzelnes zu analysierendes Molekül (z. B. ein Zytokin) ist. Es wurden *CaptureBeads* für IL-4, IL-5 und IL-13 verwendet. In einer zweiten, ebenfalls 1 h dauernden, Inkubation wurden dann 25 µl eine Antikörper-Mischung (*Detection*-Antikörper) zugefügt. Die *Detection*-Antikörper können auch spezifisch an die zu analysierenden Moleküle der Probe binden und sind zusätzlich mit dem Reporter-Molekül PE (Phycoerythrin) konjugiert, so dass die *Beads* nach einem Waschschrift mit einem Durchflusszytometer analysiert werden können. Mit Hilfe der entsprechenden FCAP Array™ Software (Soft Flow Hungary Ltd.) kann für jede spezifische *Bead*-Population (IL-4, IL-5 und IL-13) der Median der Fluoreszenz-Intensität (*median fluorescence intensity*, MFI) bestimmt werden. Dieser MFI-Wert wird mit zunehmender Bindung des zu analysierenden Moleküls und der damit verbundenen PE-konjugierten *Detection*-Antikörper größer. Durch die Generierung

einer Standard-Kurve kann so die Konzentration an Zytokinen in den zu untersuchenden Proben quantifiziert werden.

3.2.5. ZYTOKINQUANTIFIZIERUNG IN ZELLKULTUR-ÜBERSTÄNDEN

3.2.5.1. PRINZIP

Um die löslichen Zytokine in den Überständen der verschiedenen Zellkulturen zu detektieren und quantitativ zu bestimmen, wurden ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) durchgeführt (s. Abb. 3.5).

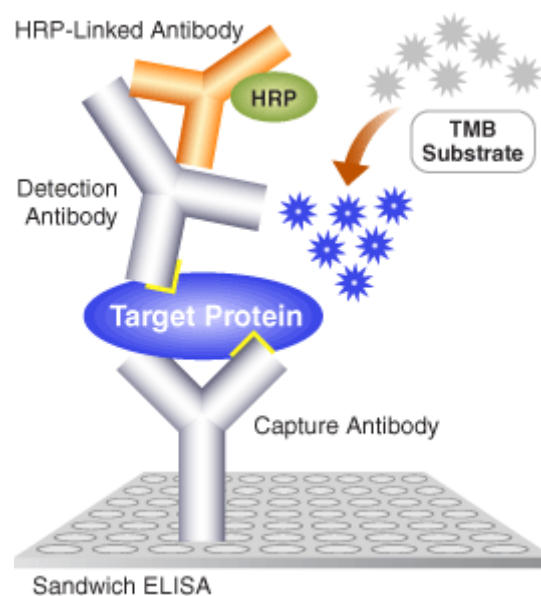


Abb. 3.5 **Schematische Darstellung der Methode des Sandwich ELISA.** Der auf einer Platte immobilisierte Primär-Antikörper bindet das Ziel-Protein, z. B. ein bestimmtes Zytokin oder Antigen. Der Sekundär-Antikörper bindet das Zielprotein an einer anderen Stelle, so dass ein Sandwich-Komplex entsteht. Durch Zugabe von Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP) entsteht ein Komplex mit dem die Antigene detektiert werden können, da das Enzym ein zugefügtes Substrat zu farbigen Produkten umsetzen kann. (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA)

Die ELISA-Systeme wurden auf dem Prinzip der Sandwich-Technik entwickelt. Immunglobuline haften unspezifisch auf Kunststoffoberflächen. Antikörper gegen die zu testende Substanz werden über unspezifische Wechselwirkungen auf eine Flachboden-Mikrotiterplatte gekoppelt (*Coaten*). Nach dem Entfernen überschüssiger Antikörper (Waschen) werden die nichtbesetzten Absorptionsstellen auf der Oberfläche mit Serumproteinen abgedeckt (Blocken). Die Zellüberstände werden aufgebracht und die darin vorhandene zu bestimmende Substanz bindet spezifisch

an den ersten Antikörper. Ein zweiter Biotin-konjugierter Antikörper reagiert mit einer anderen Antigen determinanten der an den ersten Antikörper gebundenen zu bestimmenden Substanz (Sandwich-Komplex). Unter Zugabe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates (Streptavidin-*Horseradish* Peroxidase, HRP) und anschließend des Substrates erfolgt die enzymatische Substratumsetzung. Die durch Peroxidase umgesetzte Substratmenge ist direkt proportional der Konzentration der zu bestimmenden Substanz. Eine fotometrische Messung liefert durch den Vergleich mit der Standardkurve ein quantitatives Ergebnis.

3.2.5.2. MAUS IL-2-, IL-10-, IFN-GAMMA UND TGF- β -ELISA

Der ELISA zur Bestimmung von TGF- β in den Zellkulturüberständen (Human/Mouse TGF β 1 ELISA Ready-SET-Go![®]) wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei der Durchführung des TGF- β ELISA musste das TGF- β in den zu analysierenden Überständen aus den Zellkulturen vor dem Einsatz für den ELISA durch Säure aktiviert werden. Pro 100 μ l Überstand wurden 20 μ l einer 1 N HCL-Lösung zugefügt. Nach 10 Min bei RT erfolgte die Neutralisation mit 20 μ l einer 1N NaCl-Lösung. Der dem Kit beigegefügte Standard benötigte keine Aktivierung.

Die ELISA Duo-Sets zur Bestimmung von IL-2, IFN- γ und IL-10 in den Zellkultur-Überständen wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Alle Inkubationsschritte wurden bei RT durchgeführt. Für die Beschichtung einer 96-*well* Mikrotiterplatte mit dem Primärantikörper wurden die Antikörper in einem Volumen von 100 μ l aufgetragen und über Nacht inkubiert. Die Verdünnung der Primär-Antikörper erfolgte in PBS. Nach der Inkubation des Primär-Antikörpers über Nacht wurden die Platten dreimal mit je 200 μ l des Waschpuffers gespült und nachfolgend mit je 250 μ l pro *well* Blocklösung für eine Stunde inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift in dessen Anschluss die Zellkultur-Überstände in einem Volumen von 100 μ l pro *well* aufgetragen wurden. Der Standard der entsprechenden Zytokine in einer 2-fachen seriellen Verdünnung mit Medium in einer Doppelbestimmung in von 100 μ l pro *well* aufgetragen. Die Inkubationszeit für die Verdünnungen des Standards und der Zellkultur-Überstände betrug 2 h. Danach wurden durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer alle nicht gebundenen Antigene entfernt. Die biotinylierten Sekundär-Antikörper wurden danach jeweils in einem Volumen von 100 μ l pro *well*

auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach erneutem Waschen zur Entfernung von nicht gebundenen Detektionsantikörpern wurden in jedes *well* der Mikrotiterplatten 100 µl des Konjugats aus Streptavidin und HRP zugegeben und für 20 - 30 Min im Dunklen inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem Streptavidin-Konjugat wurden die Platten erneut mit 200 µl pro *well* Waschpuffer gewaschen. Für die enzymatische Reaktion der HRP wurden 100 µl pro *well* Substratlösung, bestehend aus Substrat A und Substrat B im Verhältnis 1:1 zugefügt. Nach 5 bis 15 Min Inkubationszeit im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption des Farbstoffs mittels eines Mikroplatten-Absorptionsreaders bestimmt. Die Konzentrationen der zu untersuchenden Zytokine wurden mit Hilfe des Programms MikroWin (Version 3.0 und Version 2000, Mikrotek Laborsysteme GmbH) berechnet.

3.3. VERSUCHSVERLAUF, APPLIKATION UND ZELLKULTUR

3.3.1. UNTERSUCHUNG DER ANTIGEN-SPEZIFISCHEN T-ZELL-AKTIVIERUNG *IN VIVO*

5×10^6 CFSE-markierte $CD3^+$ T-Zellen aus der Milz von DO11.10 Tieren wurden in 100 µl PBS i.v. in die Schwanzvene injiziert. In verschiedenen Ansätzen zur Untersuchung der Funktion von T-Zellen aus den LN nach Trauma wurden zusätzlich zu den 5×10^6 DO11.10 noch 5×10^6 unmarkierte $CD3^+$ T-Zellen aus den LN von Wildtyptieren appliziert (s. Versuchsverlauf im Ergebnisteil). Einen Tag später wurden den Versuchstieren OVA (0,5 mg/ml) im Volumen 30 µl/ Fuß s.c. in die Fußsohle injiziert. Bei Versuchsreihen mit i.m. Applikation wurde OVA (0,5 mg/ml) im Volumen $3 \times 20 \mu\text{l} \Sigma 30 \mu\text{g}$ / Bein i.m. in den *musculus gastrocnemius* injiziert. Nach drei Tagen erfolgte die Entnahme der poplitealen LN mit anschließender Isolierung der Zellen und deren Restimulation *in vitro* (s. Abb. 3.6).

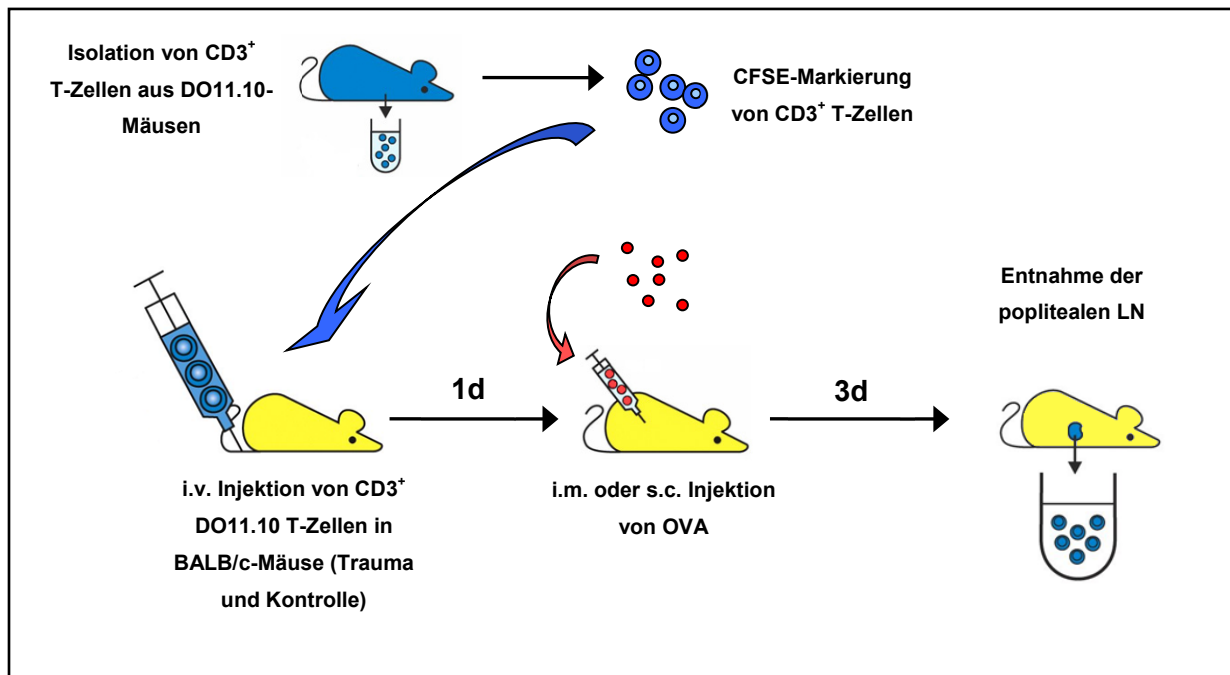


Abb. 3.6 Versuchsverlauf zur Untersuchung der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung in vivo

3.3.2. OVA-SPEZIFISCHE T-ZELL-AKTIVIERUNG IN VITRO

Die unter Punkt 3.2.1.2 und 3.2.1.3 gewonnenen T-Zellen und APZ wurden für diesen Versuchsansatz verwendet. Die in der Kultur benutzten APZ wurden vor dem Aussähen mit 5 Gy bestrahlt und dann zur T-Zellstimulation eingesetzt. Durch die Bestrahlung wird die Proliferation der APZ inhibiert ohne deren Funktion zu beeinträchtigen. Zur Untersuchung der endogenen T-Zellen wurden in einer Kultur 3×10^5 naive APZ mit 2×10^5 naiven CD3⁺ DO11.10 Zellen und in verschiedenen Ansätzen $0,5 - 2 \times 10^5$ CD3⁺ T-Zellen aus Trauma-/ Kontroll-behandelten (24 h nach Trauma) Tieren pro 200 µl in Triplikaten in 96 well Flachbodenplatten ausgesät und mit 100 µg/ml pOVA stimuliert. Als Negativkontrolle dienten eine Kultur ohne endogene T-Zellen von Kontroll-/ Trauma-behandelten Tieren und ein Ansatz ohne Stimulation. Nach drei Tagen Stimulation erfolgte eine Zytokinbestimmung im Überstand der Kultur mittels ELISA.

3.4. STATISTISCHE ANALYSEN

Für statistische und graphische Analysen wurde die Software GraphPad 4.0 verwendet. Die Ergebnisse wurden dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD für *Standard Deviation*). Die Unterschiede zwischen den Kontroll- und Trauma-behandelten-Gruppen wurden mit einem ungepaarten *student* t-Test untersucht. Die Darstellung der bakteriellen Beladung der Lungen erfolgte als eine Punktwolke, die die Streuung der einzelnen Messwerte veranschaulicht und den Median beinhaltet. Hier wurden die Daten mit Hilfe des nicht-parametrischen *Mann-Whitney-U-Tests* analysiert. Ein Ergebnis ab $p < 0.05$ wurde als signifikant erachtet.

4. ERGEBNISSE

Zur Charakterisierung der Immunmodulation nach stumpfem Weichteiltrauma galt es herauszufinden, welche zellulären Faktoren des Immunsystems dabei zentral sind und wie eine Modulation in Gegenwart eines bakteriellen Antigens aussehen könnte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob ein stumpfes Weichteiltrauma zu einer Suppression führt. Dazu wurde modellhaft die Antigen-spezifische T-Zell Antwort im drainierenden LN als *Readout* gewählt. Im Folgenden wurden zelluläre Bestandteile des Immunsystems, die an einer Immunantwort nach Trauma im geschädigten Gewebe und LN beteiligt sind, untersucht. Weiterhin sollte der genaue Mechanismus einer Trauma-induzierten Immunmodulation untersucht werden und eine im Modell gezeigte Immunantwort in Infektionsmodellen bestätigt werden. Arbeitsgruppenintern ist bekannt, dass APZ im regenerierenden Gewebe erscheinen, um Reparatur- und Regenerationsmechanismen einzuleiten. Als Teil dieser APZ finden sich auch DC im geschädigten Muskel. Deren Funktion ist bei Reparaturmechanismen jedoch weitestgehend unbekannt. Es wurde daher im Weiteren untersucht, ob durch gezielte Stimulation der DC im geschädigten Muskel eine Immunantwort in drainierenden LN moduliert werden kann.

4.1. ANALYSE DER ANTIGEN-SPEZIFISCHEN T-ZELL-AKTIVIERUNG NACH S.C. ANTIGEN-APPLIKATION

Ziel dieses Versuches war es herauszufinden, wie eine Immunantwort im drainierenden LN aussieht, wenn es zum simulierten Kontakt mit einer bakteriellen Komponente kommt. Der popliteale LN drainiert sowohl den *m. gastrocnemius* als auch die Fußsohle. Eine Applikation in die hintere Fußsohle löst somit eine Immunantwort im drainierenden LN unter Umgehung des traumatisierten Gewebes aus.

Für den Versuch wurden, wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben, CFSE-markierte CD3⁺ DO11.10 Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Kontroll- bzw. Trauma-Behandlung i.v. injiziert. Einen Tag später, d. h. an Tag 1, 4 oder 7 nach Trauma erfolgte eine s.c. Applikation von OVA. Drei Tage darauf wurden die poplitealen LN entnommen und die LNC wurden mit pOVA in einer *in vitro* Kultur restimuliert. Die Mengen an

Zytokinen im Überstand wurde mittels ELISA quantifiziert (s. Punkt 3.2.4 und 3.3.1). Die OVA-spezifischen T-Zellen in den LN wurden außerdem durchflusszytometrisch auf ihren Aktivierungsgrad und die Proliferation hin geprüft.

Als Kontrolle dafür, dass nur die Antigen-spezifischen T-Zellen spezifisch eine Immunantwort für das Antigen zeigen, wurde eine Experiment gewählt, in dem Kontroll- / Trauma-behandelten Tieren das Antigen appliziert wurde ohne vorherige Gabe der Antigen-spezifischen T-Zellen. Eine Restimulation der LNC in diesem Versuchsansatz führte zu keiner nachweisbaren Zytokinproduktion im Überstand der Kultur. Eine graphische Darstellung wird daher nicht gezeigt.

4.1.1. REINHEIT VON CD3⁺ DO11.10 ZELLEN

Um die Reinheit der mittels autoMACS isolierten CD3⁺ DO11.10 Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Dafür wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD3 gefärbt. Der *DotPlot* in Abb.4.1 zeigt eine Auftrennung der Zellen nach CD3 und FL2-H (rot fluoreszierender Farbkanal). Die CD3⁺ Population liegt im markierten Bereich. Die Reinheit lag im Durchschnitt bei > 95 %.

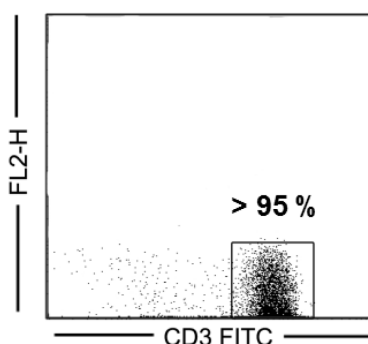


Abb. 4.1 Anreicherung von CD3⁺ DO11.10 Zellen. CD3⁺ DO11.10 Zellen wurden mittels autoMACS aufgereinigt und, durchflusszytometrisch untersucht. Im DotPlot werden die Zellen nach CD3 und FL2-H (PE fluoreszierender Farbkanal) aufgetrennt. Die CD3 Population liegt im markierten Bereich. Im Durchschnitt lag die Reinheit bei > 95 %. Es wird ein repräsentatives Experiment gezeigt.

4.1.2. CD25 UND CD69 EXPRESSION ANTIGEN-SPEZIFISCHER T-ZELLEN *IN VIVO*

Zur Überprüfung des Aktivierungsgrades der OVA-spezifischen T-Zellen wurde vor einer *in vitro* Restimulation eine Probe der LNC mit Antikörpern gegen CD4, CD69, CD25 und KJ1-26 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 4.2 A zeigt die Färbung von CD4 gegen KJ1-26 von LNC. Die Population der i.v. applizierten CD4⁺KJ1-26⁺ Zellen wurde gated und ihr Aktivierungszustand gemäß ihrer Expression von CD25 und CD69 untersucht. Die Abbildung zeigt weiterhin, dass es zu keiner Proliferation der CD4⁺KJ1-26⁺ Zellen kommt. Abbildung 4.2 B und 4.2 C zeigen die CD25 bzw. CD69 Expression der OVA-spezifischen T_H-Zellen von LNC aus Tieren, die 24 h, vier Tage bzw. sieben Tage nach Trauma- oder Kontroll-Behandlung OVA erhalten hatten.

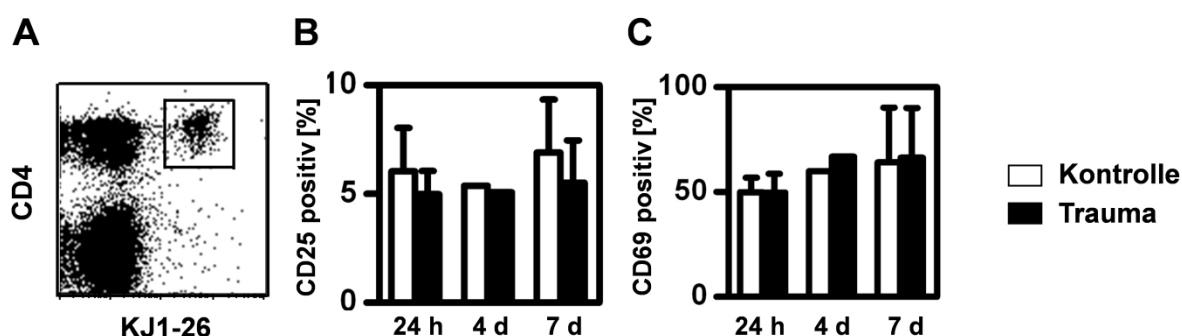


Abb. 4.2 Aktivierungszustand von CD4⁺ DO11.10 Zellen nach s.c. Applikation von OVA. Drei Tage nach s.c. Applikation wurden die poplitealen LN entnommen und die LNC wurden durchflusszytometrisch auf ihren Aktivierungsgrad überprüft. A: In einem DotPlot wird die Population der CD4⁺ DO11.10 Zellen gated dargestellt. Der DotPlot zeigt ein repräsentatives Experiment. B/C: Der Anteil der CD25 bzw. CD69 exprimierenden CD4⁺KJ1-26⁺ Zellen der jeweiligen Versuchsgruppen und Zeitpunkte wird als Balkendiagramm in einem Graphen dargestellt und verglichen. Die Mittelwerte aus $n = 3$ Experimenten mit drei Tieren pro Versuchsgruppe werden bei Kontrolle und Trauma mit Standardabweichung gezeigt.

Der Anteil an DO11.10 Zellen im LN variierte zwischen den einzelnen Versuchen, war aber in den untersuchten Versuchsgruppen ähnlich hoch und lag zwischen 4 - 6 %. Die OVA-spezifischen T_H-Zellen aus den LN von Kontrolltieren exprimierten zu einem Anteil von 6 - 8 % CD25 und zu einem Anteil von 50 - 60 % CD69, unabhängig vom Zeitpunkt der OVA-Applikation. Die OVA-spezifischen T-Zellen aus den LN der Trauma-Tiere zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CD25 oder CD69 im Vergleich zu den T-Zellen der Kontrolltiere.

4.1.3. PROLIFERATION ANTIGEN-SPEZIFISCHER T-ZELLEN *IN VIVO*

Zur Betrachtung der Proliferation der OVA-spezifischen T_H -Zellen wurde die Verteilung der CFSE-Markierung in den gegateten $CD4^+KJ1-26^+$ Zellen betrachtet. Im Histogramm wurden ca. 2500 Zellen angezeigt. Jeder Teilungspunkt wird durch einen *Peak* im Histogramm der CFSE-Messung sichtbar.

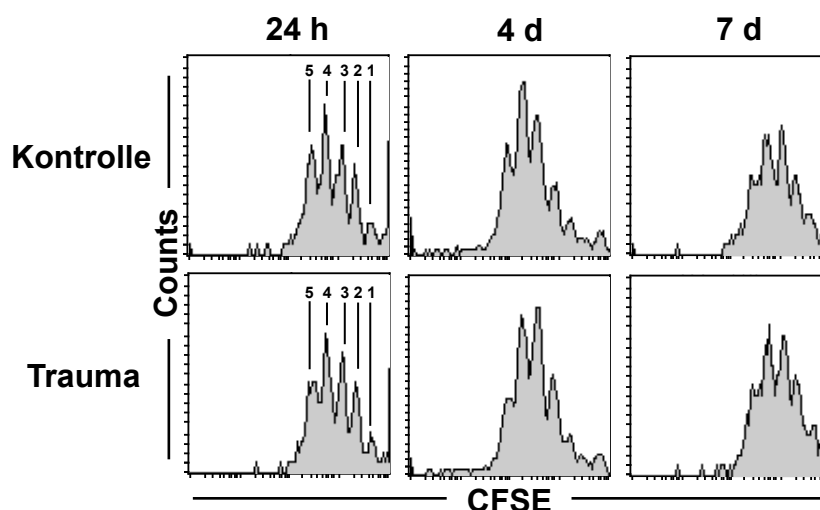


Abb. 4.3 **Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen *in vivo***. Drei Tage nach s.c. Applikation wurden die poplitealen LN entnommen und die LNC wurden durchflusszytometrisch auf ihre Proliferation überprüft. In Histogrammen wird die Proliferation der $CD4^+KJ1-26^+$ T_H -Zellen dargestellt. Jeder Peak in den Histogrammen stellt eine Teilung der Zellen dar (s. Markierung). Die dargestellten Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ mit drei Tieren pro Versuchsgruppe.

In Abb. 4.3 erkennt man zum Zeitpunkt 24 h, vier Tage und sieben Tage nach Trauma fünf *Peaks* bei Kontrolle und Trauma (s. Markierung). Die Höhe der *Peaks* variierte zwischen den einzelnen Versuchen. Jedoch ließ sich anhand der *Peak*-Anzahl die Teilungshäufigkeit bzw. Proliferation bestimmen. Die Proliferation der OVA-spezifischen T_H -Zellen war zu jedem Zeitpunkt in den Kontroll- und Trauma-behandelten Tieren ähnlich ausgeprägt.

4.1.4. RESTIMULATION VON LNC *IN VITRO*

Die Restimulation der LNC in Kultur erfolgte wie unter Punkt 3.1.4 beschrieben. Der Aktivierungszustand der LNC nach *in vitro* Restimulation wies in allen Versuchsreihen bei Kontrolle und Trauma auf eine Aktivierung aller T-Zellen hin. Die Proliferationshistogramme zeigten nach Restimulation keinen Unterschied zwischen

Kontrolle und Trauma. Die graphische Darstellung der Daten bezüglich ihrer Aktivität und Proliferation wird daher nicht gezeigt.

4.1.5. ZYTOKIN-EXPRESSION IM ANTIGEN-SPEZIFISCHEN T-ZELL- ASSAY *IN VITRO*

Eine Quantifizierung der Zytokine IFN- γ , IL-2 und IL-10 im Überstand der restimulierten LNC erfolgte nach drei Tagen Kultur (s. Punkt 3.2.4.2). Gezeigt werden in Abb. 4.4 Balkendiagramme, in denen die produzierte Zytokinmenge von Kontrolle und Trauma unter Berücksichtigung der Stimulation und des Zeitpunkts nach Trauma gezeigt werden. Die Werte der T_H2 Zytokine IL-4, IL-5, und IL-13 lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze. Daten werden daher nicht gezeigt.

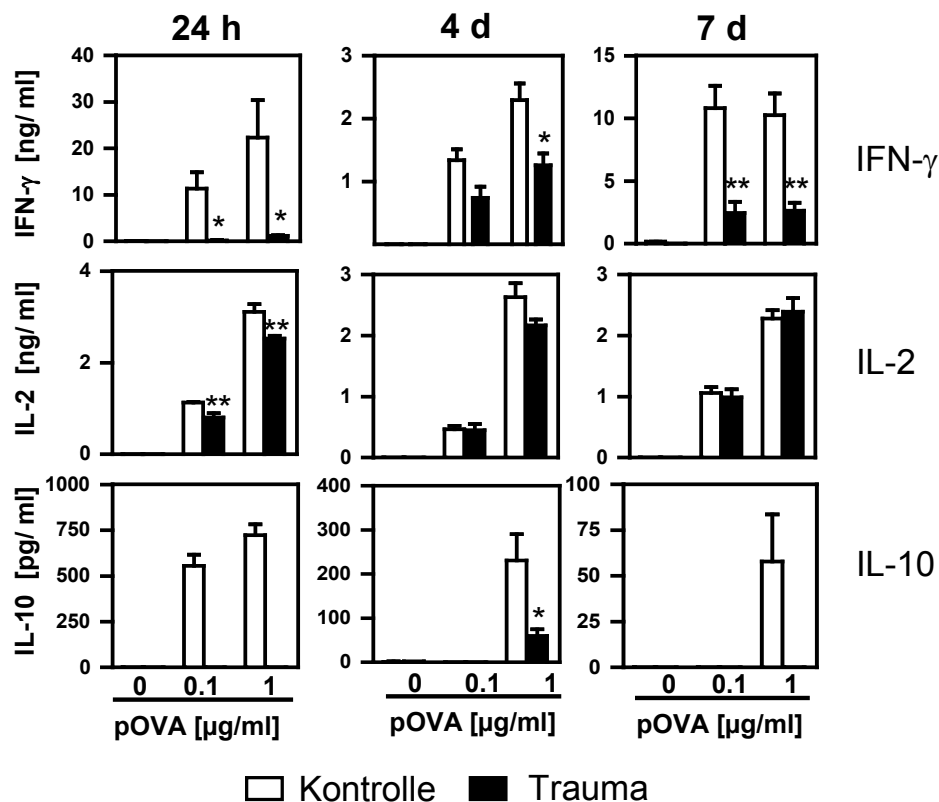


Abb. 4.4 Subkutane Antigen-Applikation. Zytokin-Expression der LNC nach Restimulation. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung und Applikation der Antigen-spezifischen T-zellen, erfolgte die s.c. Injektion des Antigens. Drei Tage später wurden die LN entnommen. Eine Quantifizierung der Zytokine von IFN- γ , IL-2 und IL-10 im Überstand der restimulierten LNC erfolgte nach drei Tagen Kultur. Gezeigt werden Balkendiagramme, in denen die Zytokinmenge von LNC aus Kontroll- und Trauma-behandelten Tieren unter Berücksichtigung der Stimulationsart und des Zeitpunkts in den Überständen eines dreitägigen Assay gemessen wurde. Für jeden Zeitpunkt und jede Stimulationsart wurden die Triplikate des Assay gemittelt und mit Standardabweichung dargestellt. Es wird zu jedem Zeitpunkt ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ mit drei Versuchstieren pro Versuchsgruppe gezeigt. Die Unterschiede wurden mit Hilfe des ungepaarten „student t-test“ analysiert. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Die Zytokin-Produktion ohne pOVA-Stimulus lag zu keinem Zeitpunkt über der Nachweisgrenze. Mit pOVA restimulierte LNC aus Kontroll-behandelten Tieren produzierten bis zu 22 ng/ml IFN- γ . Dabei variierte die IFN- γ Produktion zwischen den einzelnen Experimenten. Zu jedem Zeitpunkt nach Kontroll- oder Trauma-Behandlung synthetisierten die restimulierten LNC aus den Trauma-behandelten Tieren signifikant weniger IFN- γ als die Zellen der Kontroll-behandelten Tiere. Bei den IL-2 Messungen sah man 24 h nach Trauma eine leicht verringerte Zytokin-Expression gegenüber der Kontrolle. An Tag 4 und 7 nach Trauma erkannte man ähnliche Zytokinmengen in den Überständen der Kontroll- bzw. Trauma-behandelten Tiere. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied bei diesen Zeitpunkten und Stimulationsarten erkennen.

Die Ergebnisse der IL-10 Zytokinquantifizierung zeigten generell eine schwache Expression, die kaum nachweisbar war. Die IL-10 Produktion ohne Stimulus war auch hier zu allen Zeitpunkten bei Kontrolle und Trauma nicht zu erkennen. Bei einer Restimulation zeigte sich eine ähnliche Varianz in der IL-10 Produktion zwischen den einzelnen Experimenten wie in der IFN- γ Produktion. Dabei konnte auch hier zu jedem Zeitpunkt nach Kontroll- oder Trauma-Behandlung beobachtet werden, dass die restimulierten LNC aus den Trauma-behandelten Tieren signifikant weniger IL-10 als die Zellen der Kontroll-behandelten Tiere synthetisierten.

Als Kontrolle dafür, dass nur die Antigen-spezifischen T-Zellen spezifisch eine Immunantwort für das Antigen zeigen, wurde eine Experiment gewählt, in dem Kontroll- / Trauma-behandelten Tieren das Antigen appliziert wurde ohne vorherige Gabe der Antigen-spezifischen T-Zellen. Eine Restimulation der LNC in diesem Versuchsansatz führte zu keiner nachweisbaren Zytokinproduktion im Überstand der Kultur. Eine graphische Darstellung wird daher nicht gezeigt.

Gelangt ein Antigen nach Applikation in die Fußsohle in den poplitealen LN, so kommt es dort zur Aktivierung und Proliferation von Antigen-spezifischen T_H-Zellen. In Kontroll-behandelten Tieren findet dabei eine Polarisierung der T_H-Zellen in Richtung T_H1 statt. Im Fall einer vorhergehenden Schädigung des Gastrocnemius-Muskels wird die T_H1-Polarisierung gehemmt.

4.2. NACHWEIS DES ANTIGENS IN DEN POPLITEALEN LYMPHKNOTEN

Um auszuschließen, dass durch das induzierte Weichteiltrauma die Lymphbahn geschädigt wird und daher das Antigen nicht vollständig oder gar nicht den LN erreicht, wurde OVA-FITC oder unmarkiertes OVA s.c. in die Fußsohle sieben Tage nach Kontroll- bzw. Trauma-Behandlung injiziert. Die LNC wurden 2 Tage später präpariert, gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Eine Antigen-Aufnahme und der -Transport wurden am Beispiel von DC, als professionelle APZ untersucht. Dazu wurde ein Antikörper gegen CD11c, dem spezifischen Marker von DC, gewählt. Abbildung 4.5 zeigt in *DotPlots* CD11c positive Zellen, die aufgetrennt nach CD11c und OVA-FITC bzw. nach OVA (Negativkontrolle zu OVA-FITC) dargestellt werden.

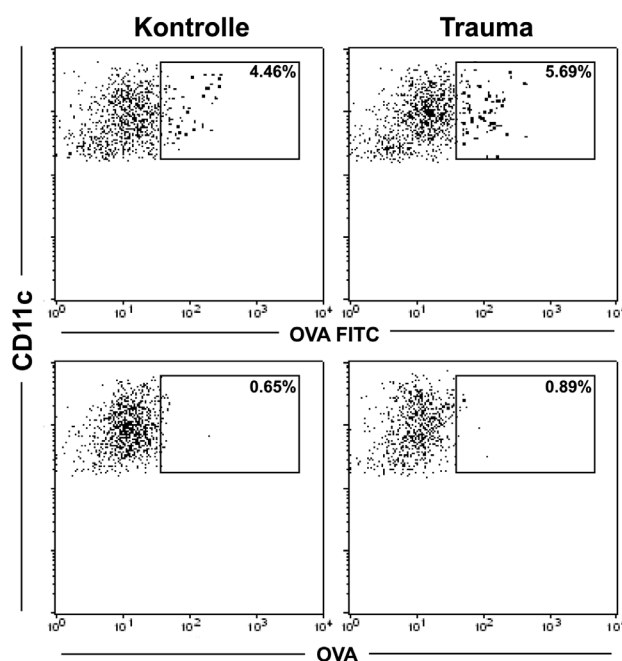


Abb. 4.5 OVA-FITC⁺ DC im LN von Kontroll- und Trauma-behandelten Tieren. OVA-FITC oder unmarkiertes OVA wurde sieben Tage nach Kontroll- bzw. Trauma-Behandlung s.c. in die Fußsohle der Tiere injiziert. Zwei Tage später wurden die LNC präpariert und gefärbt. CD11c⁺ Zellen wurden gated und auf ihren Anteil an OVA-FITC durchflusszytometrisch untersucht. In DotPlots wird der Anteil an OVA-FITC⁺ DC in LN von Kontroll- und Traumatieren verglichen. Des Weiteren wird die Negativkontrolle (OVA) zu OVA-FITC zur Abgrenzung des positiven FITC-Signals gezeigt. Es wurde bei Kontrolle und Trauma ähnlich viele OVA-FITC⁺ DC im drainierenden LN gemessen. Für jeden Plot wird ein Experiment aus $n = 3$ gezeigt.

Nach s.c. Applikation wurde kein Unterschied in dem Anteil an OVA-beladenen DC zwischen Kontrolle und Trauma erkannt. Die Wanderung von OVA-beladenen DC in

den LN wurde durch das Trauma nicht beeinträchtigt. Die Negativkontrolle OVA ohne Farbkonjugat zeigte, dass im gleichen Messfenster wie bei OVA-FITC wenige Zellen zu messen waren.

4.3. UNTERSUCHUNG EINER BEEINTRÄCHTIGTEN ANTIGENPRÄSENTATION IN DEN LYMPHKNOTEN

Die zuvor gezeigten Ergebnisse zeigen, dass es nach Weichteiltrauma und anschließender subkutaner Antigen-Applikation zu einer verminderten Antigen-spezifischen T_H1 -Polarisierung kommt. Eine Aktivierung und Proliferation der T_H -Zellen ist nicht beeinträchtigt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Antigen-beladene DC in den drainierenden Lymphknoten wandern, ohne Unterschied zwischen der Kontroll- und Trauma-behandelten Gruppe.

Die nach Weichteiltrauma verminderte $IFN-\gamma$ Produktion könnte demnach auf eine eingeschränkte Antigenpräsentation durch die einwandernden DC im LN zurückzuführen sein. Daher wurde ein Versuchsansatz gewählt, in dem eine mögliche Beeinträchtigung der APZ untersucht wurde (s. Abb. 4.6).

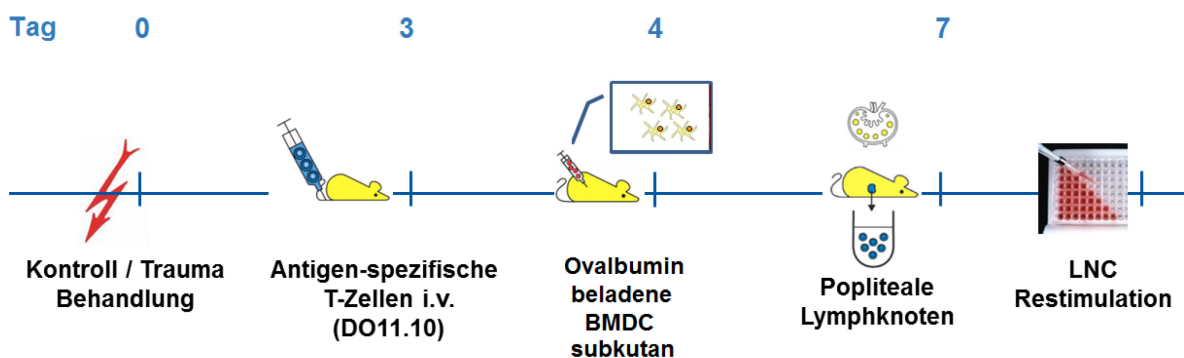


Abb. 4.6 Versuchsverlauf zur Untersuchung einer Beeinträchtigung von APZ nach Trauma. Drei Tage nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung wurden $CD3^+$ DO11.10 T-Zellen i.v. in naive Versuchstiere appliziert. Vierundzwanzig h später erfolgte die Applikation von OVA-beladenen BMDC subkutan. Nach weiteren 3 Tagen wurden die poplitealen LN entnommen und die gewonnenen Zellen in Kultur restimuliert.

Um dies zu überprüfen wurden im Vorfeld, wie unter Punkt 3.1.7 beschrieben, naive BMDC generiert und mit OVA für 1h beladen. Des Weiteren wurden für diesen Versuch, wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben, CFSE-markierte $CD3^+$ DO11.10 Zellen drei Tage nach Kontroll- bzw. Trauma-Behandlung i.v. injiziert. Einen Tag später,

d. h. an Tag 4 nach Trauma, erfolgte die s.c. Applikation der OVA-beladenen BMDC. Drei Tage darauf wurden die poplitealen LN entnommen und die LNC wurden mit pOVA in einer *in vitro* Kultur restimuliert. Der Überstand wurde mittels Zytokinquantifizierung im ELISA untersucht. Die OVA-spezifischen T-Zellen in den LN wurden außerdem durchflusszytometrisch auf ihren Aktivierungsgrad und die Proliferation hin geprüft.

Die *in vitro* generierten BMDC wurden vor einer Applikation durchflusszytometrisch untersucht, um ihre Qualität und Funktion als APZ zu überprüfen. Abbildung 4.7 zeigt die Färbung von CD11c gegen MHC-Klasse-II von generierten BMDC. Der Prozentsatz CD11c positiver Zellen lag im Durchschnitt bei 60 -70 %. Des Weiteren betrug die Expression von MHC-Klasse-II auf CD11c⁺ Zellen im Durchschnitt 80%.

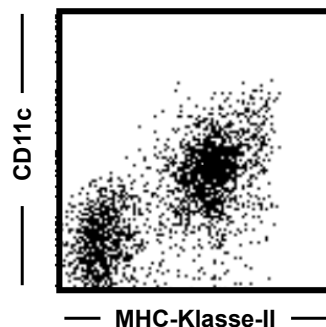


Abb. 4.7 Reinheit der generierten BMDC. Die *in vitro* generierten BMDC wurden vor einer Applikation durchflusszytometrisch untersucht, um ihre Qualität und Funktion als APZ zu überprüfen. Im DotPlot werden die generierten BMDC nach CD11c und MHC-Klasse-II aufgetrennt. Die Zahl der CD11c⁺ Zellen lag im Durchschnitt bei 60- 70 % und die Expression von MHC-Klasse-II auf CD11c⁺ Zellen lag bei ca. 80 %. Es wird ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ gezeigt.

4.3.1. CD25 UND CD69 EXPRESSION ANTIGEN-SPEZIFISCHER T-ZELLEN *IN VIVO*

Der Aktivierungszustand der T_H-Zellen im LN wurde auch in diesem Experiment überprüft. Dabei konnte kein Unterschied zwischen der Kontroll-/ Trauma-behandelten Gruppe in der Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 erkannt werden. Es wird der Anteil an CD69 und CD25 positiven T_H-Zellen in den jeweiligen Ansätzen in Abbildung 4.8 dargestellt.

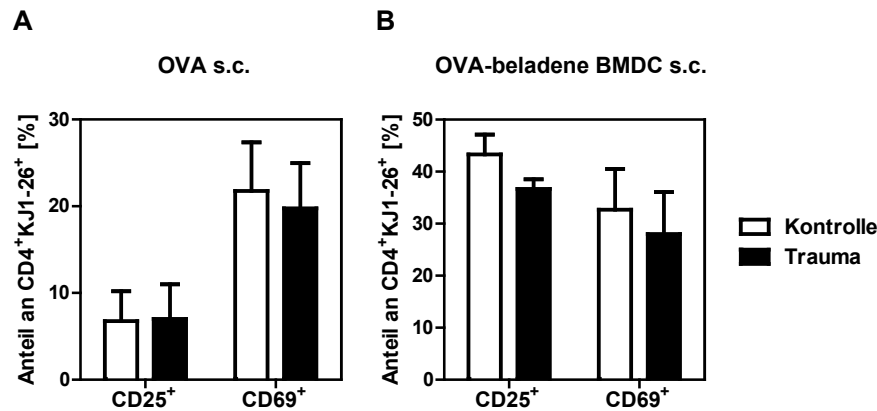


Abb. 4.8 **Aktivierungszustand von CD4⁺ DO11.10 Zellen nach s.c. Applikation von OVA-beladenen BMDC:** Der Anteil an CD69⁺ und CD25⁺ CD4⁺KJ1-26⁺ T_H-Zellen der jeweiligen Versuchsgruppen wird als Balkendiagramm in einem Graphen dargestellt und verglichen. (A) Gezeigt wird der Aktivierungszustand nach subkutaner Applikation von löslichem OVA. (B) Gezeigt wird der Aktivierungszustand nach subkutaner Applikation von OVA-beladenen BMDC. Die Mittelwerte aus $n = 3$ Experimenten mit drei Tieren pro Versuchsgruppe werden bei Kontrolle und Trauma mit Standardabweichung gezeigt

4.3.2. PROLIFERATION ANTIGEN-SPEZIFISCHER T-ZELLEN *IN VIVO*

Zur Betrachtung der Proliferation der OVA-spezifischen T-Zellen wurde die Verteilung der CFSE-Markierung in den gegateten CD4⁺KJ1-26⁺ Zellen bestimmt. Jeder Teilungspunkt wird durch einen *Peak* im Histogramm der CFSE-Messung sichtbar.

In Abb. 4.9 erkennt man nach Applikation von löslichem OVA sieben *Peaks* bei Kontrolle und Trauma. Betrachtet man die Proliferation der Antigen-spezifischen Zellen nach Injektion von OVA-beladenen BMDC, so zeigten sich auch hier in Kontrolle und Trauma sieben *Peaks*. Jedoch fiel hier die Anzahl der geteilten Zellen kleiner aus. Die Höhe der *Peaks* variierte zwischen den einzelnen Versuchen. Jedoch ließ sich anhand der *Peak*-Anzahl die Teilungshäufigkeit bzw. Proliferation bestimmen. Die Proliferation der OVA-spezifischen T_H-Zellen war zu jedem Zeitpunkt in den Kontroll- und Trauma-behandelten Tieren ähnlich ausgeprägt.

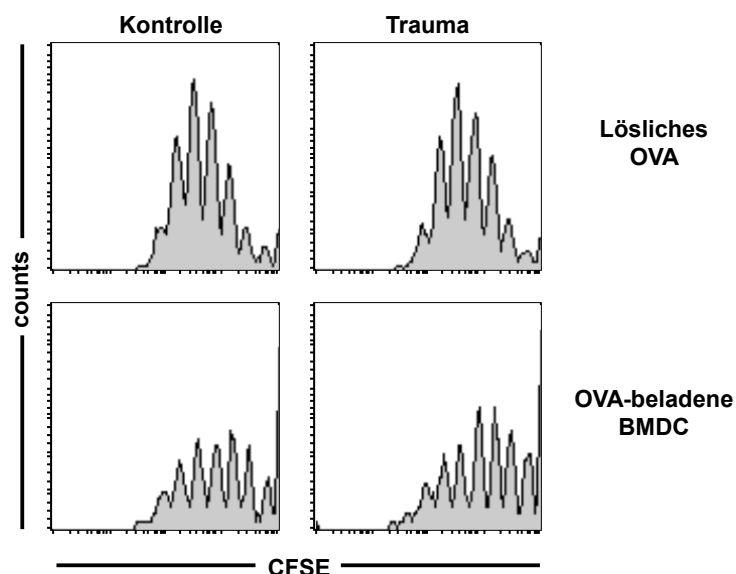


Abb. 4.9 **Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen in vivo.** Drei Tage nach s.c. Applikation von löslichem OVA oder Ova-beladenen BMDC wurden die poplitealen LN entnommen und die LNC wurden durchflusszytometrisch auf ihre Proliferation überprüft. In Histogrammen wird die Proliferation der $CD4^+KJ1-26^+$ Zellen dargestellt. Jeder Peak in den Histogrammen stellt eine Teilung der Zellen dar. Die oben dargestellten Histogramme zeigen die Proliferation der Antigen-spezifischen T-Zellen nach subkutaner OVA-Applikation. Die unten dargestellten Histogramme zeigen die Proliferation der Antigen-spezifischen T-Zellen nach subkutaner Applikation von OVA-beladenen BMDC. Die dargestellten Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ mit drei Tieren pro Versuchsgruppe.

4.3.3. ZYTOKIN-EXPRESSION IM ANTIGEN-SPEZIFISCHEN T-ZELL- ASSAY IN VITRO

In Abb. 4.10 wird die Zytokinquantifizierung von $IFN-\gamma$ im Überstand der restimulierten Zellen nach drei Tagen Kultur gezeigt. Balkendiagramme stellen die produzierte Zytokinmenge von LNC aus Kontroll- und Trauma-behandelten Tieren unter Berücksichtigung der Stimulation dar. Die Menge des Zytokins IL-10 lag in diesen Versuchsansätzen unterhalb der Nachweisgrenze. Bei der Bestimmung der Zytokinmenge an IL-2 konnte kein Unterschied zwischen den zu untersuchenden Gruppen erkannt werden. Eine graphische Darstellung wird daher nicht gezeigt.

Nach Gabe von OVA in die Fußsohle konnte, wie zuvor bereits gezeigt, eine verminderte $IFN-\gamma$ Expression in der Trauma-behandelten Gruppe beobachtet werden (s. Abb. 4.10A). Nach Applikation der OVA-beladenen BMDC zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine stärkere Expression von $IFN-\gamma$ gegenüber der Applikation mit löslichem OVA. Die restimulierten LNC der Trauma-behandelten Tiere

produzierten signifikant mehr IFN- γ als die Tiere der Kontroll-behandelten Gruppe (s. Abb. 4.10B).

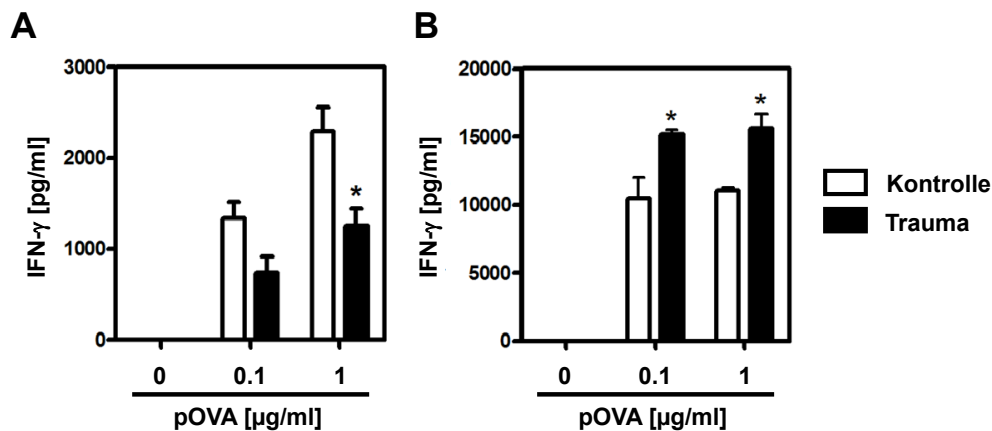


Abb. 4.10 Zytokin-Expression nach Applikation von OVA-beladenen BMDC in vitro. Eine Quantifizierung des Zytokins IFN- γ im Überstand der restimulierten LNC erfolgte nach drei Tagen Kultur. Dargestellt werden Balkendiagramme, in denen die IFN- γ Zytokinproduktion von Kontrolle und Trauma unter Berücksichtigung der Stimulationsart gemessen wurde. Abbildung A zeigt die Zytokinproduktion der Zellen aus den Tieren, denen lösliches OVA subkutan injiziert wurde. Abbildung B zeigt die Zytokinproduktion der Zellen aus den Tieren, denen OVA-beladene BMDC subkutan appliziert wurden. Für jede Stimulationsart wurden die Triplikate des Assay gemittelt und mit Standardabweichung dargestellt. Es wird ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ mit drei Versuchstieren pro Gruppe dargestellt. Die Unterschiede wurden mit Hilfe des ungepaarten „student t-test“ analysiert. * $p < 0.05$.

Eine Hemmung der T_H1-Polarisierung nach Weichteiltrauma hängt möglicherweise von der Art der APZ während der T_H-Zell Aktivierung ab.

4.4. UNTERSUCHUNG DER BETEILIGUNG VON ENDOGENEN T-ZELLEN BEI DER ENTSTEHUNG EINER IMMUNDYSFUNKTION

Die subkutane Applikation des Fremdanigens führte zu einer Hemmung T_H1-Polarisierung der Antigen-spezifischen T_H-Zellen im drainierenden Lymphknoten. Dies wird möglicherweise durch unterschiedliche Eigenschaften von APZ verursacht. Des Weiteren wurde untersucht, ob auch Zellen des adaptiven Immunsystems an der Entwicklung der T-Zell Modulation nach Trauma beteiligt sind. Dazu wurden zunächst endogene T-Zellen, als potentiell Ziel einer Modulation durch Trauma, an einer Beteiligung der Weichteiltrauma-induzierten Immundysfunktion betrachtet. Die dem jeweiligen Punkt zugeordneten Versuchsverläufe schildern den experimentellen Ablauf und sollen dem Verständnis dienen.

4.4.1. ANALYSE EINES ADOPTIVTRANSFERS VON T-ZELLEN IN NAIVE VERSUCHSTIERE

Um zu prüfen, ob bereits nach Trauma endogene T-Zellen im LN vorliegen, die die Aktivität der applizierten OVA-spezifischen T_H-Zellen modifizieren könnten, wurden CD3⁺ T-Zellen aus Tieren nach Kontroll- bzw. Trauma-Behandlung zusammen mit DO11.10 T-Zellen i.v. in naive Versuchstiere appliziert. Vierundzwanzig h später wurde den Tieren OVA s.c. injiziert und insgesamt vier Tage nach i.v. Applikation erfolgte die Lymphknotenentnahme mit anschließender Restimulation in Kultur (s. Punkt 3.1.4 und Abb. 4.11). Die Zellen wurden im Anschluss durchflusszytometrisch untersucht und mittels ELISA erfolgte eine Zytokinquantifizierung der Überstände der restimulierten Zellen.

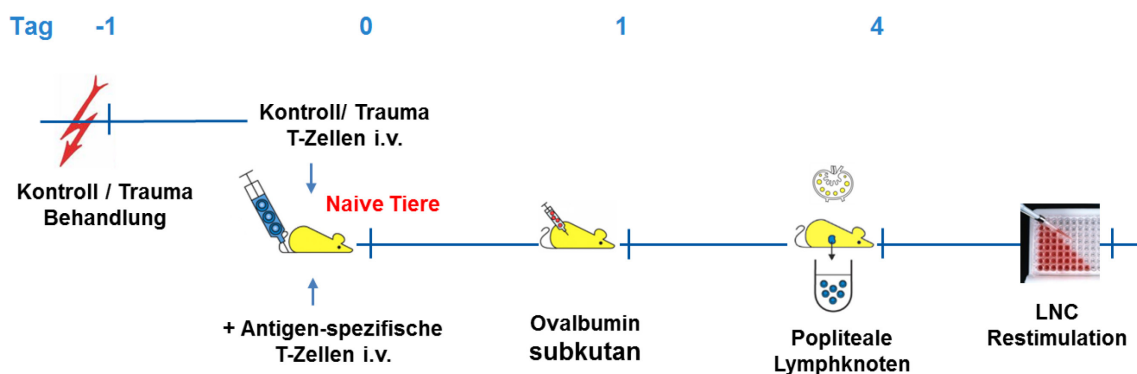


Abb. 4.11 Versuchsverlauf zur Untersuchung der Beteiligung von endogenen T-Zellen. Vierundzwanzig h nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung wurden CD3⁺ T-Zellen aus den poplitealen LN isoliert und zusammen mit CD3⁺ DO11.10 T-Zellen i.v. in naive Versuchstiere appliziert. Vierundzwanzig h später erfolgte die Applikation des Antigens subkutan. Nach weiteren drei Tagen wurden die poplitealen LN entnommen und die gewonnenen Zellen in Kultur restimuliert.

Eine T-Zell Hemmung wird häufig durch die Aktivität von Treg vermittelt. Daher wurden T-Zellen aus den LN der Trauma- und Kontroll-behandelten Tiere auf ihren Anteil an regulatorischen T-Zellen untersucht, bevor sie in naive Tiere appliziert wurden. Dabei zeigte sich in beiden Versuchsgruppen ein gleich großer Anteil an CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen in den LN. Ein verändertes Zytokinbild von IL-10 und TGF-β wurde ebenfalls nicht beobachtet. Eine graphische Darstellung erfolgt daher nicht.

Der Anteil an DO11.10 Zellen in den LN war in allen Tieren ähnlich. Vor der Restimulation wurden die T-Zellen aus den LN auf ihren Aktivierungszustand und die

Proliferationsrate untersucht. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den zu untersuchenden Gruppen erkannt werden. Gezeigt wird der Aktivierungszustand der Antigen-spezifischen T_H -Zellen (s. Abb. 4.12). Auf die Darstellung der Proliferation wird verzichtet.

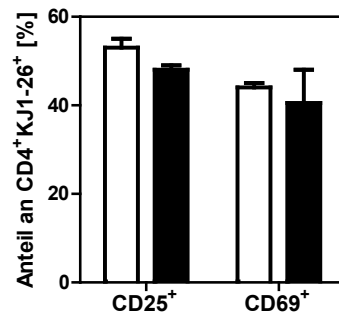


Abb. 4.12 Aktivierungszustand von CD4⁺ DO11.10 Zellen nach Adoptivtransfer von T-Zellen aus Trauma-behandelten Tieren: Der Anteil an CD69⁺ und CD25⁺ CD4⁺KJ1-26⁺ T_H-Zellen wird als Balkendiagramm in einem Graphen dargestellt und verglichen. Gezeigt wird der Aktivierungszustand nach subkutaner Applikation von löslichem OVA. Die Mittelwerte aus $n = 3$ Experimenten mit drei Tieren pro Versuchsgruppe werden bei Kontrolle und Trauma mit Standardabweichung gezeigt

In Abb. 4.13 wird die Zytokinquantifizierung von IFN- γ und IL-10 im Überstand der restimulierten Zellen nach drei Tagen Kultur gezeigt. Balkendiagramme stellen die produzierte Zytokinmenge von Kontrolle und Trauma unter Berücksichtigung der Stimulation dar. Die Diagramme zeigen die Daten von Versuchsgruppen, die 5×10^6 Kontroll-/ Trauma-T-Zellen in Kombination mit 5×10^6 DO11.10 Zellen appliziert bekommen hatten. Bei der Bestimmung der Zytokinmenge an IL-2 konnte kein Unterschied zwischen den zu untersuchenden Gruppen erkannt werden. Eine graphische Darstellung wird daher nicht gezeigt.

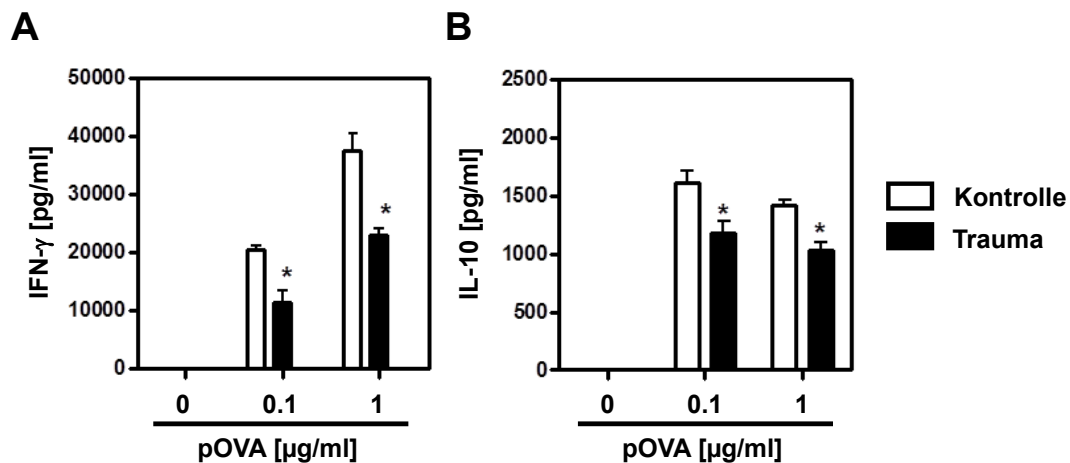


Abb. 4.13 Einfluss endogener T-Zellen. Zytokin-Expression der LNC nach Restimulation. Um zu prüfen, ob bereits nach Trauma endogene T-Zellen im LN vorliegen, die die Aktivität der applizierten OVA-spezifischen T-Zellen modifizieren könnten, wurden $CD3^+$ T-Zellen aus Tieren nach Kontroll- bzw. Trauma-Behandlung zusammen mit DO11.10 T-Zellen i.v. in naive Versuchstiere appliziert. Eine Quantifizierung der Zytokine IFN- γ und IL-10 im Überstand der restimulierten LNC erfolgte nach drei Tagen Kultur. Dargestellt werden Balkendiagramme, in denen die Zytokinproduktion von LNC der Kontroll- und Trauma-behandelten Gruppen unter Berücksichtigung der Stimulationsart gemessen wurde. Für jede Stimulationsart wurden die Triplikate des Assay gemittelt und mit Standardabweichung dargestellt. Es wird ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ mit drei Versuchstieren pro Gruppe dargestellt. Die Unterschiede wurden mit Hilfe des ungepaarten „student t-test“ analysiert. * $p < 0.05$.

In dem Überstand der Kontroll-behandelten Versuchsgruppe wurde nach Restimulation mit pOVA 0.1 µg/ml ca. 20000 pg/ml IFN- γ produziert. Bei einer Stimulation mit pOVA 1 µg/ml fiel die Zytokinmenge größer aus. Bei den Tieren, die Zellen aus Trauma-behandelten Tieren appliziert bekommen hatten, wurde signifikant weniger IFN- γ als in der Kontroll-behandelten Versuchsgruppe produziert. Diese verringerte Zytokinproduktion war bei beiden Stimuli zu erkennen. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch bei Betrachtung der IL-10 Produktion beobachtet. Hier wurde im Überstand der Kontroll-behandelten Versuchsgruppe nach Restimulation mit pOVA 0.1 µg/ml ca. 1500 pg/ml IL-10 produziert. Bei einer Stimulation mit pOVA 1 µg/ml fiel die Zytokinmenge ähnlich groß aus. Im Vergleich dazu zeigten Tiere, die Zellen aus Trauma-behandelten Tieren appliziert bekommen hatten, eine signifikant geringere IL-10-Freisetzung als in der Kontroll-behandelten Versuchsgruppe. Diese verminderte Zytokinproduktion war bei beiden Konzentrationen der Stimuli zu beobachten.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass transferierte endogene T-Zellen aus Trauma-Tieren dazu befähigt waren, andere T-Zellen in naiven Tieren so zu modulieren, dass diese weniger Zytokine produzierten.

4.4.2. NACHWEIS EINER BETEILIGUNG ENDOGENER T-ZELLEN IM RAG-2 KNOCKOUT MODELL

Um die Rolle endogener T-Zellen nach Trauma weiter zu charakterisieren und deren Einfluss auf die Modulation der Antigen-spezifischen T-Zellen zu untersuchen, wurde ein Versuchsansatz gewählt, in dem RAG-2^{-/-} Mäuse verwendet wurden. Diesen Tieren fehlen die endogenen B-/ T-Zellen. In diesem Versuchsansatz konnte demnach eine Immunantwort ohne Einfluss endogener T-Zellen untersucht werden.

In diesem Versuchsansatz wurden RAG-2^{-/-} und RAG-2^{-/-} nach vorhergehender Applikation von naiven T-Zellen (5×10^6) untersucht. In beiden Versuchsansätzen erfolgte drei Tage nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung eine Applikation von CD3⁺ DO11.10 T-Zellen i.v. in die Versuchstiere. Vierundzwanzig h später wurde den Tieren OVA s.c. injiziert und insgesamt vier Tage nach i.v. Applikation erfolgte die Lymphknotenentnahme mit anschließender Restimulation in Kultur (s. Punkt 3.1.4 und Abb. 4.14). Die Zellen wurden im Anschluss durchflusszytometrisch untersucht und mittels ELISA erfolgte eine Zytokinquantifizierung der Überstände der restimulierten Zellen.

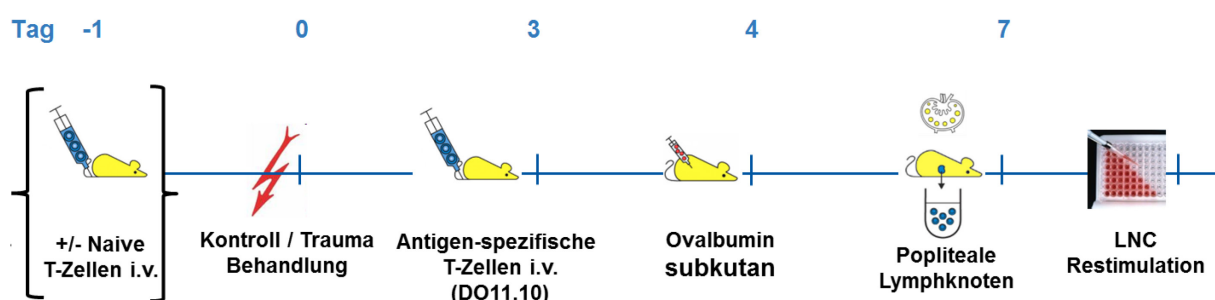


Abb. 4.14 Versuchsverlauf zur Untersuchung der Beteiligung von endogenen T-Zellen in RAG-2 knockout Mäusen. Vierundzwanzig h vor Kontroll-/ Trauma-Behandlung wurden in einem Versuchsansatz naive T-Zellen in RAG-2^{-/-} Tiere i.v. appliziert. In einem weiteren Versuchsansatz wurden keine naiven T-Zellen injiziert. In beiden Versuchsansätzen erfolgte drei Tage nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung eine Applikation von CD3⁺ DO11.10 T-Zellen i.v. in die Versuchstiere. Vierundzwanzig h später erfolgte die Applikation des Antigens subkutan. Nach weiteren drei Tagen wurden die poplitealen LN entnommen und die gewonnenen Zellen in Kultur restimuliert.

Der Anteil an DO11.10 Zellen im LN war in allen Versuchsansätzen zwischen den untersuchten Gruppen ähnlich. Vor der Restimulation wurden die T-Zellen aus dem LN auf ihren Aktivierungszustand und die Proliferationsrate untersucht. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den zu untersuchenden Gruppen erkannt werden. Gezeigt wird der Aktivierungszustand der Antigen-spezifischen T_H-Zellen in den LN von RAG-2^{-/-} Mäusen (s. Abb. 4.15). Auf die Darstellung der Proliferation wird verzichtet.

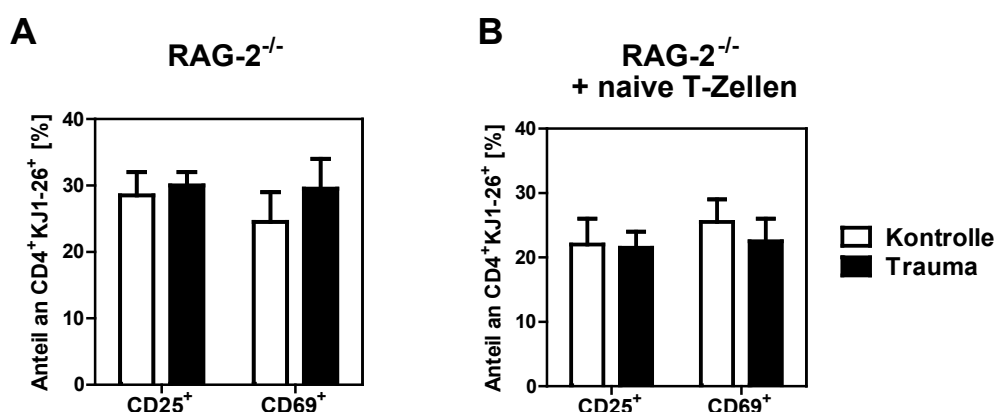


Abb. 4.15 Aktivierungszustand von CD4⁺ DO11.10 Zellen in RAG-2^{-/-} Tieren: Der Anteil an CD69⁺ und CD25⁺ CD4⁺KJ1-26⁺ T_H-Zellen der jeweiligen Versuchsgruppen wird als Balkendiagramm in einem Graphen dargestellt und verglichen. (A) Gezeigt wird der Aktivierungszustand der T_H-Zellen im RAG-2^{-/-} Tieren (B) Gezeigt wird der Aktivierungszustand von RAG-2^{-/-} Tieren nach vorhergehender Applikation von naiven T-Zellen (5×10^6). Die Mittelwerte aus $n = 2$ Experimenten mit drei Tieren pro Versuchsgruppe werden bei Kontrolle und Trauma mit Standardabweichung gezeigt

In Abb. 4.16 wird die Zytokinquantifizierung von IFN- γ im Überstand der restimulierten Zellen nach drei Tagen Kultur gezeigt. Balkendiagramme stellen die produzierte Zytokinmenge von Kontrolle und Trauma unter Berücksichtigung der Stimulation dar. Die Menge des Zytokins IL-10 lag in diesen Versuchsansätzen unterhalb der Bestimmungsgrenze. Bei der Bestimmung der Zytokinmenge an IL-2 konnte kein Unterschied zwischen den zu untersuchenden Gruppen erkannt werden. Eine graphische Darstellung wird daher nicht gezeigt.

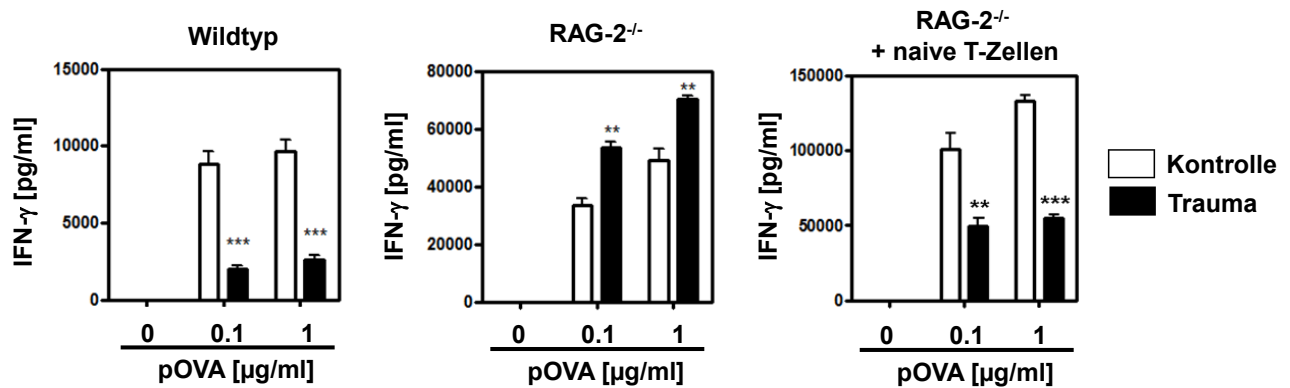


Abb. 4.16 **Immunantwort Antigen-spezifischer T-Zellen in RAG-2^{-/-} Mäusen.** Um eine Beteiligung endogener T-Zellen bei der Entstehung der Trauma-induzierten Immundysfunktion zu bestätigen, wurden DO11.10 T-Zellen i.v. in RAG-2^{-/-} (B-/T-Zell defizient) Versuchstiere, appliziert. Eine Versuchsgruppe erhielt außerdem vor Kontroll-/ Trauma-Behandlung eine Injektion mit naiven T-Zellen. Eine Quantifizierung des Zytokins IFN-γ im Überstand der restimulierten LNC erfolgte nach drei Tagen Kultur. Dargestellt werden Balkendiagramme, in denen die IFN-γ Zytokinproduktion von Kontrolle und Trauma unter Berücksichtigung der Stimulationsart in den Überständen eines dreitägigen Assay gemessen wurde. Für jede Stimulationsart wurden die Triplikate des Assay gemittelt und mit Standardabweichung dargestellt. Es wird ein repräsentatives Experiment aus n = 2 mit drei Versuchstieren pro Gruppe dargestellt. Die Unterschiede wurden mit Hilfe des ungepaarten „student t-test“ analysiert. **p < 0.01, ***p < 0.001.

Im Wildtyp zeigten die Trauma-behandelten Tiere, wie bereits unter Punkt 4.1.5 dargestellt, eine verminderte IFN-γ Produktion im Vergleich zur Kontroll-behandelten Gruppe. Betrachtet man die Zytokin-Expression im RAG-2^{-/-} Tiermodell, so zeigte sich in der Trauma-behandelten Versuchsgruppe eine signifikant verstärkte Zytokinantwort in Vergleich zur Kontroll-behandelten Gruppe. Die dritte Versuchsgruppe, RAG-2 knockout Tiere, welche vor Kontroll-/ Trauma-Behandlung naive T-Zellen i.v. erhalten hatten, zeigte im Zytokinmuster ein ähnliches Bild wie die Wildtypgruppe. So betrug die IFN-γ Expression der LNC der Trauma-behandelten Gruppe nur etwa 50% der Expression der LNC der Kontroll-behandelten Gruppe.

Die Gegenwart von endogenen T-Zellen zum Zeitpunkt des Traumas führt zu einer Hemmung der T_H1-Polarisierung von OVA-spezifischen T-Zellen.

4.4.3. WEITERE UNTERSUCHUNG ENDOGENER T-ZELLEN IN EINEM T-ZELL ASSAY *IN VITRO*

Um den Einfluss der endogenen T-Zellen auf die T_H1 -Polarisierung von OVA-spezifischen T-Zellen näher zu charakterisieren, wurde *in vitro* ein T-Zell Assay entwickelt. Mit diesem Assay sollte eine OVA-spezifische T-Zell-Aktivierung *in vitro* unter verschiedenen Konditionen untersucht werden (s. Punkt 3.3.2 und Abb. 4.17).

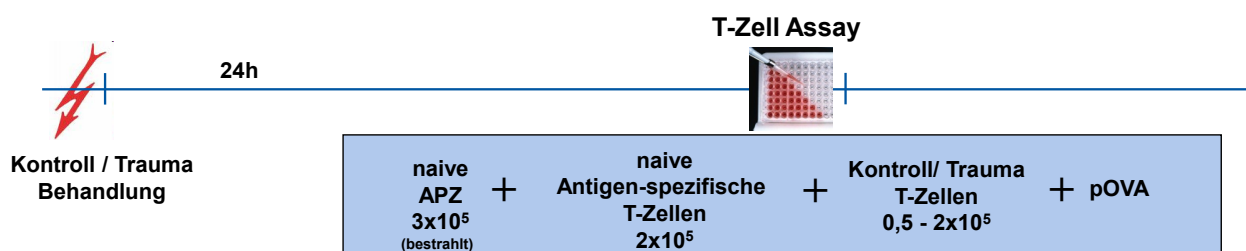


Abb. 4.17 **Untersuchung endogener T-Zellen in einem T-Zell Assay *in vitro*.** Zur Untersuchung der endogenen T-Zellen wurden in einer Kultur 3×10^5 naive APZ (bestrahlt) mit 2×10^5 naiven $CD3^+$ DO11.10 Zellen und in verschiedenen Ansätzen $0,5 - 2 \times 10^5$ $CD3^+$ T-Zellen aus Trauma-/ Kontroll-behandelten (24 h nach Trauma) Tieren mit $0.1 \mu\text{g/ml}$ pOVA stimuliert. Anschließend wurden die Zytokine in den Überständen eines dreitägigen Assay gemessen.

4.4.3.1. REINHEIT VON CD3-NEGATIVEN MILZZELLEN

Die APZ für den Assay wurden wie unter Punkt 3.2.1.3 beschrieben angereichert und nach Depletion von $CD3^+$ Zellen als APZ verwendet. Um sicherzustellen, dass bei der Depletion der $CD3^+$ Zellen aus der Milz mittels Dynabeads® eine hohe Reinheit erzielt wurde, mussten die Proben durchflusszytometrisch untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD3 markiert (s. Punkt 3.2.1.3). Der *DotPlot* in Abb.4.15 zeigt eine Auftrennung der Zellen nach CD3 und FL2-H (rot fluoreszierender Farbkanal). Die $CD3$ negative Population liegt im markierten Bereich. Die Reinheit lag im Durchschnitt bei $> 95 \%$.

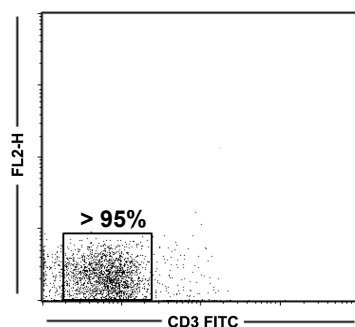


Abb. 4.18 **Anreicherung von CD3-negativen LNC.** APZ wurden mittels Dynabeads® aufgereinigt und durchflusszytometrisch. Im DotPlot werden die Zellen nach CD3 und FL2-H (PE Farbkanal) aufgetrennt. Die CD3⁻ Population (APZ) liegt im markierten Bereich. Im Durchschnitt lag die Reinheit bei > 95 %.

4.4.3.2. ZYTOKIN-EXPRESSION IM T-ZELL ASSAY NACH STIMULATION *IN VITRO*

Abbildung 4.19 zeigt die IFN- γ Zytokin-Expression im Überstand des T-Zell Assays nach drei Tagen Stimulation. Die Menge des Zytokins IL-10 lag in diesen Versuchsansätzen unterhalb der Bestimmungsgrenze. Bei der Bestimmung der Zytokinmenge an IL-2 konnte kein Unterschied zwischen den zu untersuchenden Gruppen erkannt werden. Eine graphische Darstellung wird daher nicht gezeigt.

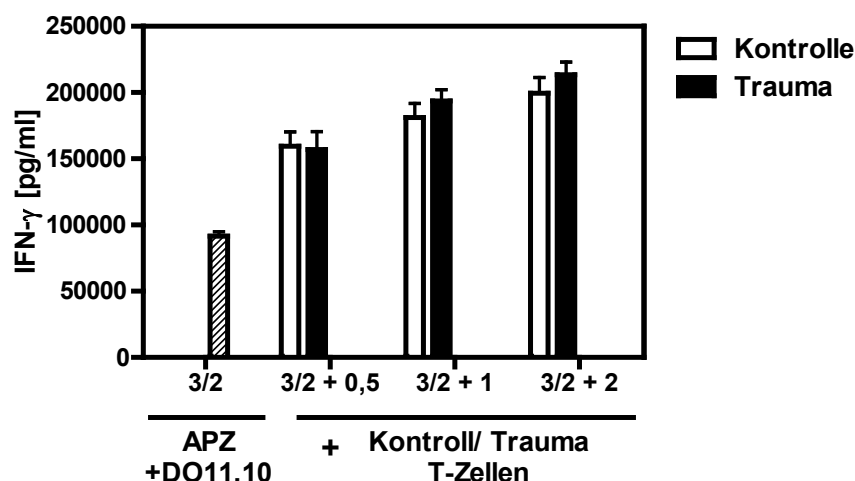


Abb. 4.19 **Zytokin-Expression im T-Zell Assay *in vitro*.** Zur Untersuchung der endogenen T-Zellen wurden in einer Kultur 3×10^5 naive APZ (bestrahlt) mit 2×10^5 naiven CD3⁺ DO11.10 Zellen und in verschiedenen Ansätzen $0,5 - 2 \times 10^5$ CD3⁺ T-Zellen aus Trauma-/ Kontroll-behandelten (24 h nach Trauma) Tieren mit $0.1 \mu\text{g/ml}$ pOVA stimuliert. Dargestellt werden Balkendiagramme, in denen die IFN- γ Zytokinproduktion bei verschiedenen Konditionen in den Überständen eines dreitägigen Assay gemessen wurde). Für jeden Ansatz wurden die Triplikate des Assay gemittelt und dargestellt. Es wird ein repräsentatives Experiment aus $n = 5$ gezeigt.

Im *in vitro* T-Zell Assay konnte durch Zugabe von 0.5×10^5 T-Zellen aus Kontroll- und Trauma-behandelten Tieren im Gegensatz zur Kontrolle (3×10^5 APZ + 2×10^5 DO11.10 Zellen) eine erhöhte IFN- γ Produktion gemessen werden. Jedoch zeigte sich kein Unterschied zwischen der Zugabe von T-Zellen aus Kontroll- oder Trauma-behandelten Tieren. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass eine größere Menge an T-Zellen (1×10^5 , 2×10^5) zu einer größeren Menge an IFN- γ führte. In allen Ansätzen fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der IFN- γ Produktion zwischen der Zugabe von T-Zellen aus Kontroll-/ Trauma-behandelten Tieren und deren Einfluss auf die Aktivierung oder Zytokinproduktion der Antigen-spezifischen T-Zellen *in vitro*.

Die Beobachtungen im *in vitro* T-Zell Assay führen zu der Annahme, dass T-Zellen nicht allein für die Vermittlung einer Immundysfunktion nach Trauma verantwortlich sind, und dass *in vivo* möglicherweise weitere Zellpopulationen beteiligt sind.

4.5. UNTERSUCHUNG DER BETEILIGUNG VON NK-ZELLEN BEI DER ENSTEHUNG EINER IMMUNDYSFUNKTION

Nachdem eine modulierende Fähigkeit von T-Zellen in den vorhergegangenen Versuchen *in vivo* aber nicht *in vitro* gesehen wurde, ging es daran, die Rolle weiterer Zellen im LN zu erforschen und Zellsubtypen zu charakterisieren. Die Rolle von NK-Zellen wurde untersucht, da diese regulatorisch auf die APZ/ T-Zell Interaktion wirken. Zur Inaktivierung/Depletion wurden den Tieren der Versuchsgruppen, wie unter Punkt 3.1.3 beschrieben, Anti asialo GM1 Antiserum bzw. Kontrollserum i.p. injiziert. Bei dem Anti asialo Serum handelt es sich um ein Serum, das aus Kaninchen gewonnen wird und die Aktivität von NK-Zellen in verschiedenen Ratten- und Maus-Stämmen eliminiert. Drei Tage nach Trauma erfolgte die Applikation der Antigen-spezifischen T-Zellen und an Tag 4 nach Trauma die Antigen-Gabe. Nach weiteren drei Tagen wurden die poplitealen LN entnommen und die LNC wurden in Kultur restimuliert (s Abb. 4.20).

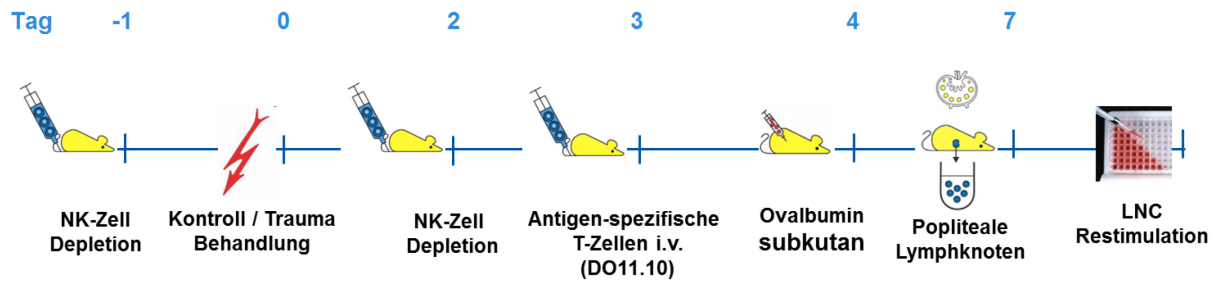


Abb. 4.20 **Versuchsverlauf zur Inaktivierung/Depletion von NK-Zellen in vivo.** Vierundzwanzig h vor und nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung wurde Anti asialo Serum bzw. Kontrollserum i.p.. appliziert. In beiden Versuchsansätzen erfolgte drei Tage nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung eine Applikation von CD3⁺ DO11.10 T-Zellen i.v. in die Versuchstiere. Vierundzwanzig h später erfolgte die Applikation des Antigens subkutan. Nach weiteren drei Tagen wurden die poplitealen LN entnommen und die gewonnen Zellen in Kultur restimuliert.

Um den Effekt der Inaktivierung/ Depletion mit Anti asialo GM1 Antiserum zu ermitteln, wurden die LNC vor der Restimulation durchflusszytometrisch auf CD3 und CD49b (DX5), der spezifische Marker für NK-Zellen, untersucht (s. Abb. 4.21).

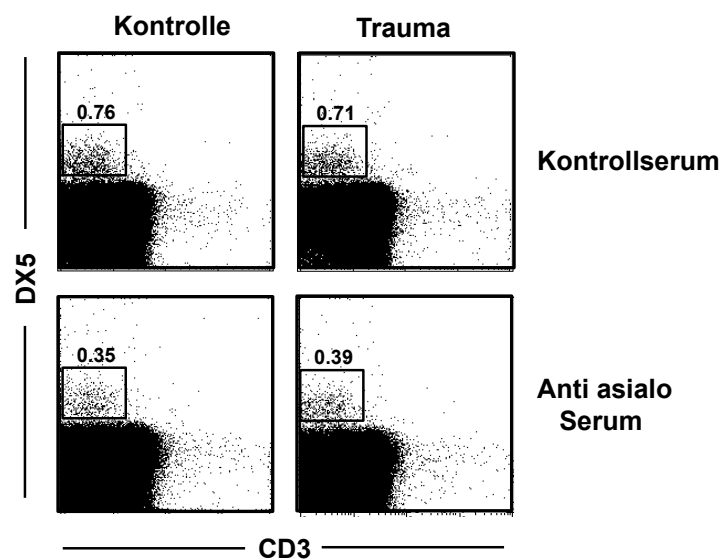


Abb. 4.21 **Effekt der NK-Zell Depletion durch Anti asialo Serum:** Die nach Depletion von NK-Zellen entnommenen LNC aus Kontroll-/ Trauma-behandelten Tieren wurden durchflusszytometrisch untersucht, um die Depletion im in vivo Versuch zu überprüfen. In DotPlots werden die LNC nach CD3 und DX5 aufgetrennt. Es wurde auf DX5⁺ Zellen gated und die Anzahl dieser Zellen im LN dargestellt. Die Zahl der DX5⁺ Zellen reduzierte sich in den LN der Kontroll-/ Trauma-behandelten Gruppe von ca. ca. 0.75% auf 0.35% der Gesamtzellennach Anti asialo Injektion. Es wird ein repräsentatives Experiment aus n = 3 gezeigt.

Die zur Depletion erforderliche Menge an Anti-asialo Serum wurde nach Angaben des Herstellers sowie durch Titration ermittelt. Die Inaktivierung von NK-Zellen

konnte auch noch 5 Tage nach der letzten Anti asialo Serum Injektion beobachtet werden und zeigte dort noch eine ca. 50%ige Reduzierung an NK-Zellen in den Lymphknoten der Kontroll- und Trauma-behandelten Versuchstiere von ca. 0.75% auf 0.35% der Gesamtzellen

4.5.1. EFFEKT DER INAKTIVIERUNG/ DEPLETION VON NK-ZELLEN AUF DIE EXPRESSION DER AKTIVIERUNGSMARKER CD69 UND CD25 AUF DEN T-ZELLEN *IN VITRO*

Um den Aktivierungszustand der T-Zellen nach Stimulation in Kultur zu ermitteln, wurden die Zellen der LN durchflusszytometrisch auf CD69 und CD25 hin untersucht. Dafür wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD69, CD25 und KJ26-1 gefärbt. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den zu untersuchenden Gruppen erkannt werden. Gezeigt wird der Aktivierungszustand der Antigen-spezifischen T_H -Zellen in den LN nach Applikation des Kontrollserums bzw. des Anti asialo Serums (s. Abb. 4.22). Auf die Darstellung der Proliferation wird verzichtet.

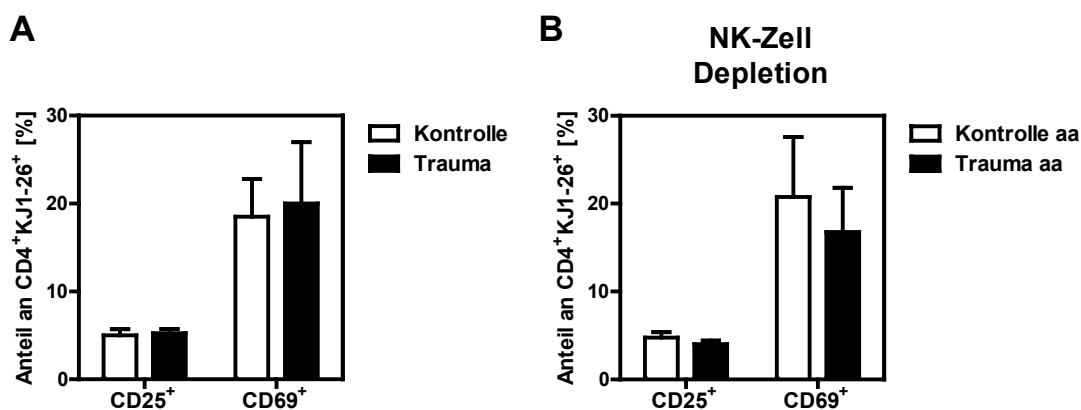


Abb. 4.22 **Aktivierungszustand von $CD4^+$ DO11.10 Zellen nach NK-Zell Depletion:** Der Anteil an $CD69^+$ und $CD25^+$ $CD4^+KJ1-26^+$ T_H -Zellen der jeweiligen Versuchsgruppen wird als Balkendiagramm in einem Graphen dargestellt und verglichen. (A) Gezeigt wird der Aktivierungszustand der T_H -Zellen im LN nach Applikation des Kontrollserums. (B) Gezeigt wird der Aktivierungszustand der T_H -Zellen nach Depletion der NK-Zellen mittels Anti asialo Serum (aa). Die Mittelwerte aus $n = 3$ Experimenten mit drei Tieren pro Versuchsgruppe werden bei Kontrolle und Trauma mit Standardabweichung gezeigt

4.5.2. EFFEKT DER NK-ZELL-INKTIVIERUNG/ DEPLETION AUF DIE ZYTOKIN-EXPRESSION DER T-ZELLEN *IN VITRO*

Gezeigt werden Balkendiagramme, in denen die IFN- γ Zytokinproduktion der LNC von Kontrolle und Trauma in den Überständen nach dreitägiger Restimulation gemessen wurde. Die mit „aa“ gekennzeichneten Ergebnisse stellen die mit Anti asialo Serum behandelten Versuchsgruppen dar (s. Abb. 4.23). Die Menge des Zytokins IL-10 lag in diesen Versuchsansätzen unterhalb der Bestimmungsgrenze. Bei der Bestimmung der Zytokinmenge an IL-2 konnte kein Unterschied zwischen den zu untersuchenden Gruppen erkannt werden. Eine graphische Darstellung wird daher nicht gezeigt.

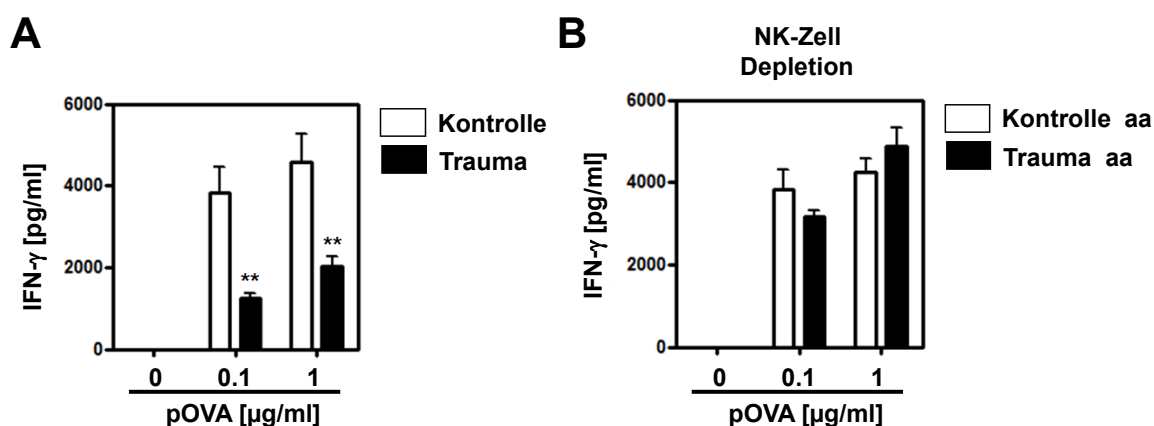


Abb. 4.23 **Zytokin-Expression nach NK-Zell-Inaktivierung *in vitro***. Zur Inaktivierung/Depletion wurden den Tieren der Versuchsgruppen, wie unter Punkt 4.20 beschrieben, Anti asialo GM1 Antiserum bzw. Kontrollserum i.p. injiziert. Eine Quantifizierung des Zytokins IFN- γ im Überstand der restimulierten LNC erfolgte nach drei Tagen Kultur. Dargestellt werden Balkendiagramme in denen die IFN- γ Zytokinproduktion von Kontrolle und Trauma unter Berücksichtigung der Stimulationsart. (A) Die Versuchsgruppe in A wurde mit Kontrollserum vorbehandelt. (B) Die mit „aa“ gekennzeichnete Versuchsgruppe zeigt die Tiere, denen *in vivo* die NK-Zellen depletiert wurden. Für jede Stimulationsart wurden die Triplikate des Assay gemittelt und mit Standardabweichung dargestellt. Es wird ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ mit drei Versuchstieren pro Gruppe dargestellt. Die Unterschiede wurden mit Hilfe des ungepaarten „student t-test“ analysiert. ** $p < 0.01$.

Die Kontroll-behandelte Gruppe zeigte nach Anti asialo Behandlung keine veränderte IFN- γ Produktion gegenüber der Kontroll-behandelten Gruppe nach Kontrollserum Behandlung. Die IFN- γ Produktion lag in beiden Fällen bei ca. 4000 pg/ml. Betrachtet man dagegen die Zytokinproduktion der Zellen aus Trauma-behandelten Tieren so zeigte sich, dass bei der Trauma-behandelten Gruppe nach Anti asialo

Applikation mehr IFN- γ produziert wurde, als in der Trauma-behandelten Gruppe, der Kontrollserum appliziert worden war. Das Experiment nach Inaktivierung/ Depletion von NK-Zellen zeigte, dass nach Depletion in der Trauma-behandelten Gruppe mehr IFN- γ produziert wurde als in der Trauma-behandelten Gruppe ohne NK-Zell-Depletion. Eine verminderte IFN- γ Produktion nach Trauma, wie es die Kontrollserum-behandelte Trauma-Gruppe zeigte, ist nach Depletion der NK-Zellen nicht mehr zu erkennen.

4.5.3. OBERFLÄCHENMOLEKÜLE AUF NK-ZELLEN NACH TRAUMA IN VIVO

Um die gezeigten Ergebnisse der NK-Zell Depletion zu deuten, wurden nach Trauma-Behandlung die NK-Zellen im drainierenden LN auf die Expression von Oberflächenmolekülen untersucht. Dazu wurden die LNC mit Antikörpern gegen CD49b oder CD335 in Kombination mit Antikörpern gegen NKG2A, NKG2D und CD69 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Neben dem Aktivierungsmarker CD69 spielen die Oberflächenmoleküle NKG2A und NKG2D eine wichtige Rolle bei der Aktivität der NK-Zellen. Die Beteiligung unterschiedlicher Expressionen von inhibierenden NKG2A und aktivierenden NKG2D Rezeptoren auf NK-Zellen wurde überprüft. Die Untersuchung dieser Faktoren zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen den NK-Zellen der Kontroll- und Trauma-behandelten Gruppe (s. Abb. 4.24).

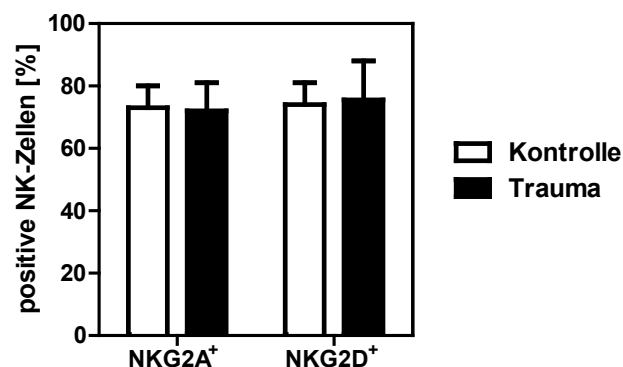


Abb. 4.24 **Aktivierungszustand von NK-Zellen nach Trauma:** Nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung wurden die NK-Zellen im drainierenden LN durchflusszytometrisch untersucht. Der NKG2A bzw. NKG2D positive Anteil an NK-Zellen Zellen der jeweiligen Versuchsgruppen wird als Balkendiagramm in einem Graphen dargestellt und verglichen. Die Mittelwerte aus $n = 2$ Experimenten mit drei Tieren pro Versuchsgruppe werden bei Kontrolle und Trauma mit Standardabweichung gezeigt.

Die Beobachtungen der NK-Zell Depletion führen zu der Annahme, dass die Abwesenheit von NK-Zellen während des Traumas zu einer der T_H1 -Polarisierung von OVA-spezifischen T-Zellen führt. Neben endogenen T-Zellen sind auch NK-Zellen an der Vermittlung einer Immundysfunktion nach Trauma beteiligt.

4.6. CHARAKTERISIERUNG DER IMMUNSUPPRESSION NACH TRAUMA IM LUNGENINFektionsMODELL *IN VIVO*

Um neben der gezeigten T_H -Zell Hemmung im drainierenden poplitealen LN auch eine Hemmung des angeborenen Immunsystems nach Weichteiltrauma zu überprüfen, wurde ein *in vivo* Lungeninfektionsmodell gewählt. Dadurch kann geprüft werden, ob es zu einer systemischen Immunsuppression nach Weichteiltrauma kommt, was wiederum eine klinische Relevanz dieser Verletzung verdeutlichen würde. Um dies zu untersuchen, wurde den Versuchstieren 4d nach Kontroll- oder Trauma-Behandlung intranasal eine nicht-letale Dosis von *P. aeruginosa* injiziert. Weitere 24 h später erfolgte die Entnahme der Lungen und anschließend die Homogenisation und Ausplattierung dieser. Nach weiteren 24h wurden die CFU ausgezählt und die bakterielle Beladung pro Lunge berechnet. (s. Punkt 3.12 und Unterpunkte, sowie Abb. 4.25).

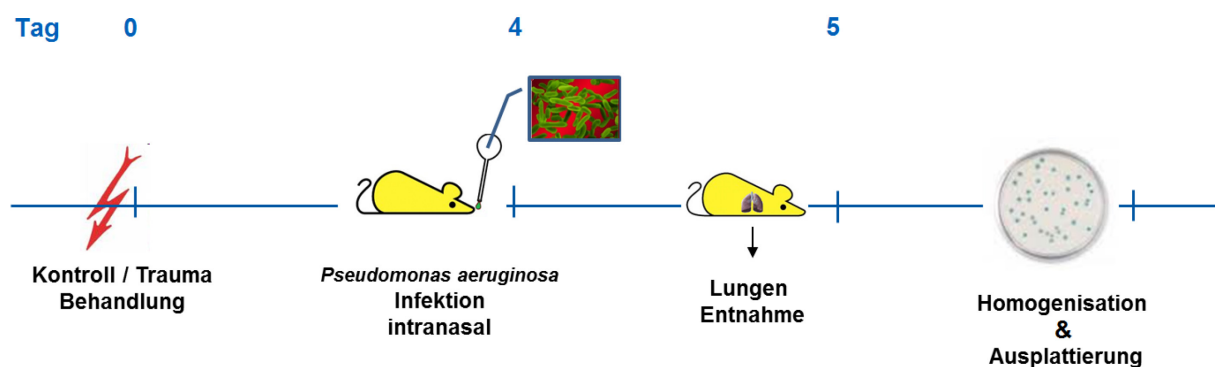


Abb. 4.25. **Versuchsverlauf im Lungeninfektionsmodell mit *P. aeruginosa* *in vivo*.** Vier Tage nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung erfolgte die einmalige intranasale Infektion mit 5×10^8 *Pseudomonas aeruginosa*. Weitere 24 h später erfolgte die Entnahme der Lungen und anschließend die Homogenisation und Ausplattierung dieser. Nach weiteren 24h wurden die CFU ausgezählt und die bakterielle Beladung pro Lunge berechnet.

Die Abbildung 4.26 zeigt Punktwolken mit Median, in denen die CFU/ Lunge der einzelnen Versuchstiere dargestellt werden. Es zeigte sich, dass die zuvor Trauma-behandelte Versuchsgruppe 24 h nach intranasaler *P. aeruginosa* Infektion eine signifikant höhere bakterielle Beladung in den Lungen hatte, als die Kontroll-behandelte Versuchsgruppe nach Infektion.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das Weichteiltrauma zu einer systemischen Suppression des Immunsystems führt.

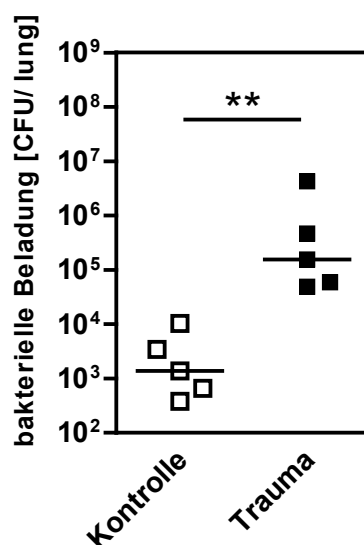


Abb. 4.26 **Bakterielle Beladung der Lungen nach *P. aeruginosa* Infektion in der Lunge.** Vier Tage nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung erfolgte eine intranasale Infektion mit *P. aeruginosa*. Vierundzwanzig h später wurden die Lungen entnommen und deren Homogenisat auf Agarplatten über Nacht inkubiert. Weitere 24 h später erfolgte die Bestimmung der bakteriellen Beladung pro Lunge (CFU/lung). Gezeigt werden die Mediane der Einzeltiere. Es wird ein repräsentatives Experiment aus $n = 2$ mit fünf Versuchstieren pro Gruppe dargestellt. Hier wurden die Daten mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test analysiert. $^{**}p < 0.01$.

4.7. CHARAKTERISIERUNG VON APZ IM MUSKEL

Im Rahmen einer Dissertation in unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Granulozyten, Makrophagen und DC den traumatisierten Muskel sequentiell infiltrieren. Des Weiteren wurde gezeigt (s. Abb. 4.10), dass die Applikation von OVA-beladenen BMDC die Hemmung der Antigen-spezifischen T_H1 -Polarisierung nach Trauma aufheben. Daher stellte sich die Frage, ob den Muskel

infiltrierende DC, die Antigen-spezifische T_H -Zell Antwort im drainierenden LN beeinflussen können.

4.7.1. EXPRESSION VON MHC-II UND CO-STIMULATORISCHEN MOLEKÜLEN AUF APZ IM MUSKEL

Voraussetzung dafür, dass DC im traumatisierten Muskel eine Funktion als APZ wahrnehmen können, ist die Expression von MHC-Klasse-II und den co-stimulatorischen Molekülen CD40, CD86 auf der Oberfläche. Um die Expression dieser Moleküle auf DC und im Vergleich dazu auf Monozyten zu bestimmen wurden Leukozyten in den Muskeln von Tieren nach Kontroll- bzw. Trauma-Behandlung durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Betrachtung der DC wurden $CD11c^+$ bzw. $CD11b^+$ Zellen gated (s. Abb.4.27).

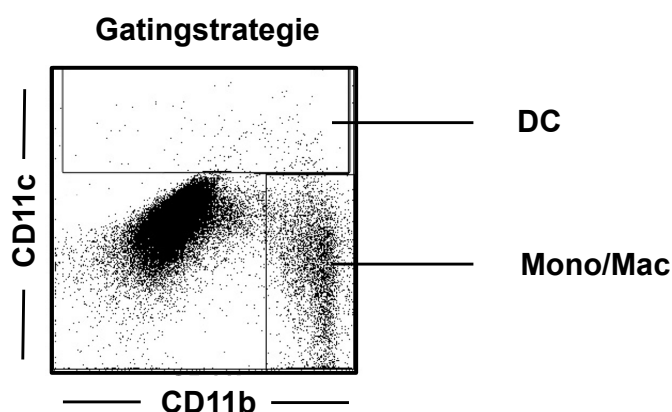


Abb. 4.27 Gatingstrategie zur Betrachtung von DC und Monozyten/ Makrophagen im Muskel. Nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung werden Gastrocnemius-Muskeln an den zu untersuchenden Zeitpunkten entnommen und die Leukozyten isoliert, gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Im DotPlot werden beispielhaft die Zellen zum Zeitpunkt 24 h nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung gegen CD11b und CD11c aufgetrennt. Die markierte $CD11b^+/ CD11c^-$ Population wurde als Monozyten/ Makrophagen (Mono/ Mac) definiert. Die $CD11c^+$ Fraktion wurde als DC definiert. Es wird ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ dargestellt.

Das Oberflächenmolekül CD11c wird auf allen DC exprimiert und ist charakteristisch für diese Zellgruppe. Die CD11c positive Population wird daher als DC deklariert und eine CD11b positive/ CD11c negative Population stellt Monozyten und Makrophagen dar.

Abbildung 4.28 A zeigt die Expression von MHC-Klasse-II auf $CD11c^+$ DC und $CD11b^-CD11b^+$ Monozyten/ Makrophagen in *DotPlots*. Diese Zeitpunkte wurden

anhand der bereits erwähnten Dissertation ausgewählt. In dieser konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zur raschen Infiltration der Granulozyten innerhalb von 24 Stunden nach Trauma, DC erst ab dem Zeitpunkt 4 bzw. 7 Tage nach Trauma verstärkt im traumatisierten Gewebe erscheinen.

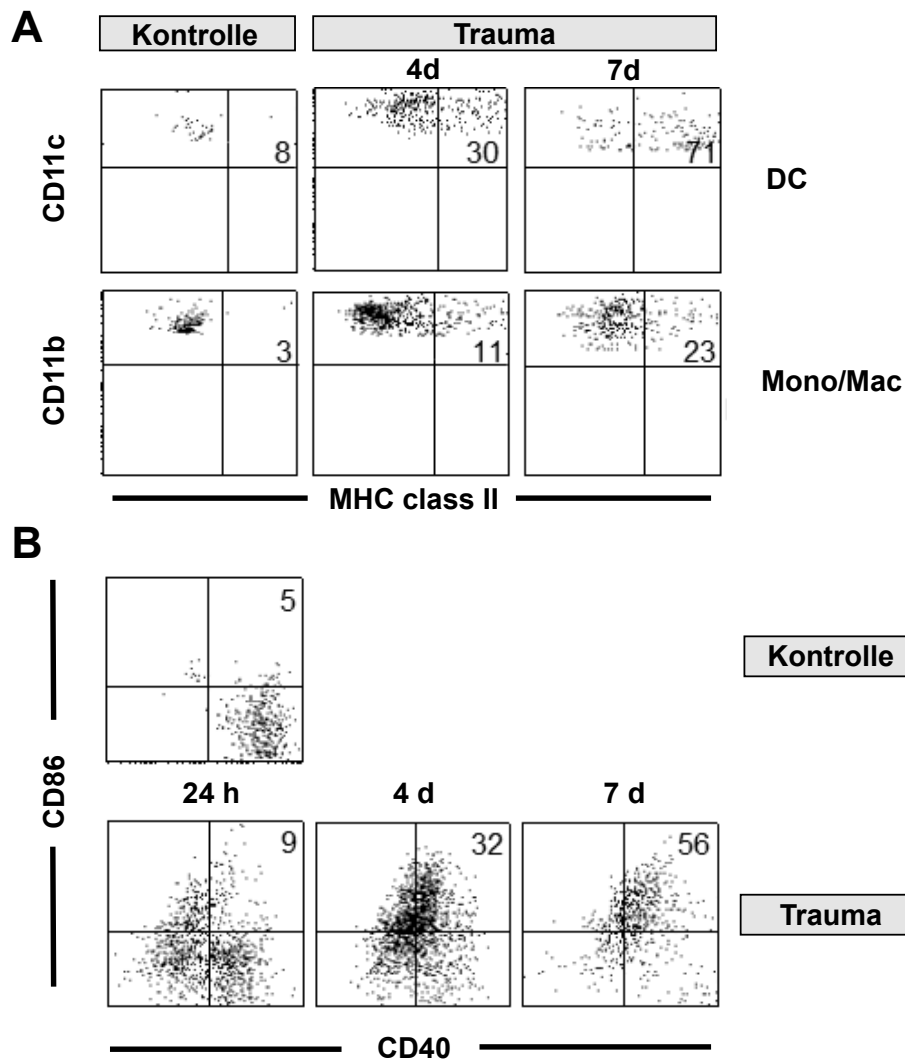


Abb. 4.28 **Charakterisierung von APZ im Muskel.** Gezeigt werden durchflusszytometrische Messungen von CD11b⁺ bzw. CD11c⁺ Zellen nach Muskelverletzung, die je nach Population gated wurden (s. Abb. 4.27). Abb. A zeigt die Expression von MHC-Klasse-II. Dabei wird nach CD11c bzw. CD11b und MHC-Klasse-II aufgetrennt. Abbildung B zeigt die Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 auf der CD11c⁺ (DC) Population. Es wird je ein repräsentativer DotPlot aus n = 3 Versuchen mit jeweils drei Tieren pro Versuchsgruppe für Kontrolle und Trauma unter Berücksichtigung des Zeitpunkts gezeigt.

Betrachtet man die gateden DC so zeigte sich, dass sich die Expression von MHC-Klasse-II positiven DC von 30% an Tag 4 nach Trauma bis hin zu 70% an Tag 7

nach Trauma erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass nur ein geringerer Anteil an Monozyten/Makrophagen MHC-Klasse-II Moleküle zu diesen Zeitpunkten exprimierten (11% Tag 4, 23% Tag 7). In den Kontroll-behandelten Tieren konnte keine verstärkte Expression von MHC-Klasse-II beobachtet werden.

Im Weiteren wurde die Expression co-stimulatorischer Moleküle auf DC untersucht. Abbildung 4.28 B zeigt in einer Kinetik *DotPlots* gatedeter DC unter Betrachtung von CD40 und CD86. Parallel wurde neben der zuvor gezeigten Expression von MHC-Klasse-II ein Zeit-abhängiger Anstieg der Expression co-stimulatorischer Moleküle auf DC von 32% an Tag 4 auf 56% an Tag 7 nach Trauma beobachtet. Es kommt demnach zu einer Zeit-abhängigen Reifung der DC im traumatisierten Gewebe.

Das Zytokin IFN- γ fördert eine Reifung von DC und könnte somit ein wichtiger Faktor bei der Reifung von DC im geschädigten Muskel sein [69]. Um eine Beteiligung von IFN- γ an der Reifung der DC im Muskel nach Trauma zu prüfen, wurde die Expression co-stimulatorischer Moleküle auf DC im Muskel von Wildtyp bzw. IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen sieben Tage nach Trauma untersucht. Abbildung 4.29 zeigt im Balkendiagramm die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD40 und CD86 auf gatedeten DC nach einem 7d Trauma in Wildtyp und IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass es zu keinem Unterschied bei der Reifung von DC im geschädigten Muskel zwischen Wildtyp und IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen kam.

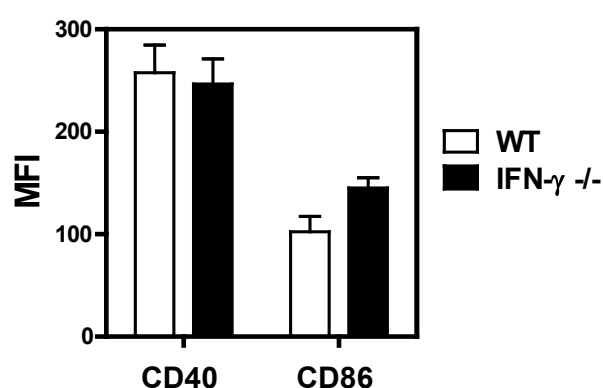


Abb. 4.29 Expression co-stimulatorischer Moleküle auf DC im Muskel von IFN- $\gamma^{-/-}$ Mäusen. Sieben Tage nach der Kontroll-/ Trauma-Behandlung werden die Gastrocnemius-Muskeln entnommen und die Leukozyten isoliert, gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Gatingstrategie siehe auch Abb. 4.27. Das Balkendiagramm zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD40 und CD86 auf gatedeten CD11c⁺ DC nach einem 7d Trauma in Wildtyp und IFN knockout Mäusen. Die Mittelwerte aus $n = 3$ Experimenten mit drei Tieren pro Versuchsgruppe werden bei Kontrolle und Trauma mit Standardabweichung gezeigt. Dabei zeigt sich kein Unterschied zwischen den Wildtyp und IFN knockout Mäusen.

Es konnte gezeigt werden, dass DC im traumatisierten Muskel an Antigen-Präsentation und T-Zell Aktivierung beteiligte Moleküle sequentiell nach Trauma exprimieren.

4.8. ANALYSE DER ANTIGEN-SPEZIFISCHEN T-ZELL-AKTIVIERUNG NACH I.M. ANTIGEN-APPLIKATION

Unter Berücksichtigung der ausgeprägten Fähigkeit der DC zur Antigenpräsentation im geschädigten Muskel zum Zeitpunkt 4 und 7 Tage nach Trauma, wurde ein Versuchsansatz gewählt, in welchem eine Antigen-spezifische T-Zellantwort im drainierenden Lymphknoten nach intramuskulärer Antigen-Gabe untersucht werden sollte. Der Versuchsablauf dieser Experimentreihe gleicht dem von Punkt 3.3.1 und Punkt 4.1 beschriebenen Abläufen. Allein die Art der Antigen-Applikation änderte sich in diesem Ansatz.

4.8.1. CD25 UND CD69 EXPRESSION ANTIGEN-SPEZIFISCHER T-ZELLEN *IN VIVO*

Zur Überprüfung des Aktivierungsgrades der OVA-spezifischen T-Zellen wurde vor einer *in vitro* Restimulation eine Probe der LNC mit Antikörpern gegen CD4, CD69, CD25 und KJ1-26 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 4.30 A zeigt die Färbung von CD4 gegen KJ1-26 von LNC. Die Population der i.v. applizierten CD4⁺KJ1-26⁺ Zellen wurde gated und ihr Aktivierungszustand gemäß ihrer Expression von CD25 und CD69 untersucht. Abbildung 4.30 B und 4.30 C zeigt die CD25 bzw. CD69 Expression der OVA-spezifischen T-Zellen von LNC aus Tieren, die 24 h, vier Tage bzw. sieben Tage nach Trauma oder Kontrollbehandlung OVA erhalten hatten.

Die OVA-spezifischen T-Zellen aus den LN von Kontroll-behandelten Tieren exprimierten zu 5 bis 10 % CD25 und zu ca. 60 % CD69 unabhängig vom Zeitpunkt der OVA-Applikation. Die OVA-spezifischen T-Zellen aus den LN der Trauma-behandelten Tiere zeigten kaum Unterschiede im Anteil positiver Zellen für CD25 oder CD69 im Vergleich zu den T-Zellen der Kontrolltiere. Nur zum Zeitpunkt 4 und 7 Tage nach Trauma zeigte sich ein leicht erhöhter Anteil von CD25⁺ Zellen im Gegensatz zur Kontrollgruppe.

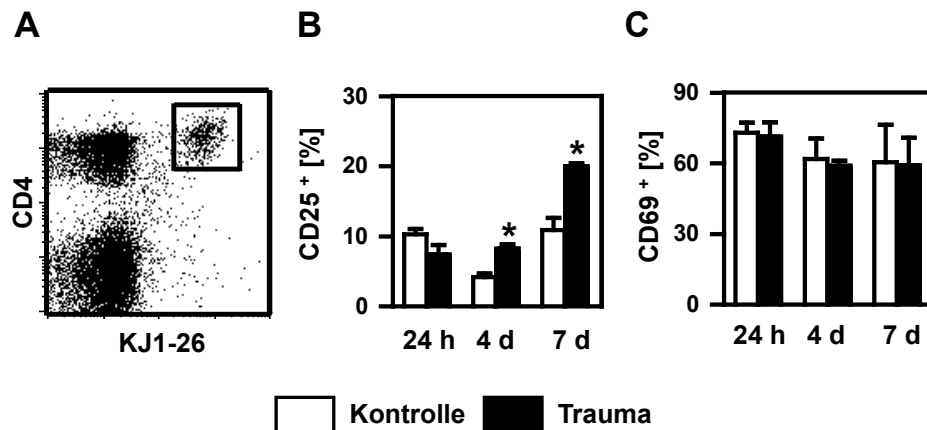


Abb. 4.30 **Aktivierungszustand von CD4⁺ DO11.10 Zellen nach i.m. Applikation von OVA.** . Drei Tage nach i.m. Applikation wurden die poplitealen LN entnommen und die LNC wurden durchflusszytometrisch auf ihren Aktivierungsgrad überprüft. A: In einem DotPlot wird die Population der CD4⁺ DO11.10 Zellen gated dargestellt. Der DotPlot zeigt ein repräsentatives Experiment aus n=3. B/ C: Der Anteil der CD25 bzw. CD69 exprimierenden CD4⁺KJ1-26⁺ Zellen der jeweiligen Versuchsgruppen und Zeitpunkte wird als Balkendiagramm in einem Graphen dargestellt und verglichen. Die Mittelwerte aus n = 3 Experimenten mit drei Tieren pro Versuchsgruppe werden bei Kontrolle und Trauma mit Standardabweichung gezeigt. Die Unterschiede wurden mit Hilfe des ungepaarten „student t-test“ analysiert. *p < 0.05.

4.8.2. PROLIFERATION ANTIGEN-SPEZIFISCHER T-ZELLEN IN VIVO

Zur Betrachtung der Proliferation der OVA-spezifischen T-Zellen wurde die Verteilung der CFSE-Markierung in den gateden CD4⁺KJ1-26⁺ Zellen betrachtet. Jeder Teilungspunkt wird durch einen *Peak* im Histogramm der CFSE-Messung sichtbar.

In Abb. 4.31 erkennt man zum Zeitpunkt 24 h bzw. vier Tage nach Trauma sechs *Peaks* bei Kontrolle und Trauma und sieben Tage nach Trauma fünf *Peaks* bei Kontrolle und Trauma. Jedoch ließ sich anhand der *Peak*-Anzahl die Teilungshäufigkeit bzw. Proliferation bestimmen. Die Proliferation der OVA-spezifischen T_H-Zellen zwischen der Kontroll- und Trauma-behandelten Gruppe war zu jedem Zeitpunkt ähnlich.

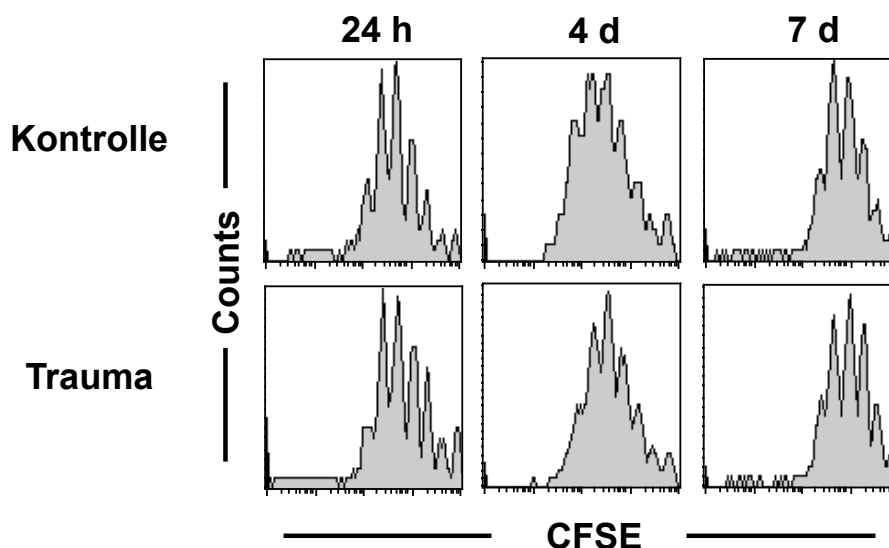


Abb. 4.31 **Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen in vivo.** Drei Tage nach i.m. Applikation wurden die poplitealen LN entnommen und die LNC wurden durchflusszytometrisch auf ihre Proliferation überprüft. In Histogrammen wird die Proliferation der $CD4^+KJ1-26^+$ T_H -Zellen dargestellt. Jeder Peak in den Histogrammen stellt eine Teilung der Zellen dar. Die dargestellten Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ mit drei Tieren pro Versuchsgruppe. Im Histogramm werden 2500 Zellen dargestellt.

4.8.3. ZYTOKIN-EXPRESSION IM ANTIGEN-SPEZIFISCHEN T-ZELL-ASSAY IN VITRO

Eine Quantifizierung von $IFN-\gamma$, IL-2 und IL-10 im Überstand der restimulierten LNC erfolgte nach drei Tagen Kultur (s. Punkt 3.2.4.2). Gezeigt werden in Abb. 4.32 Balkendiagramme, die die produzierte Zytokinmenge der LNC von Kontroll- und Trauma-behandelten Versuchstieren unter Berücksichtigung der Stimulation und des Zeitpunkts nach Trauma darstellen. Die Menge der T_H2 Zytokine IL-4, IL-5, und IL-13 in den Überständen der LNC-Kultur lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze, Daten werden daher nicht gezeigt.

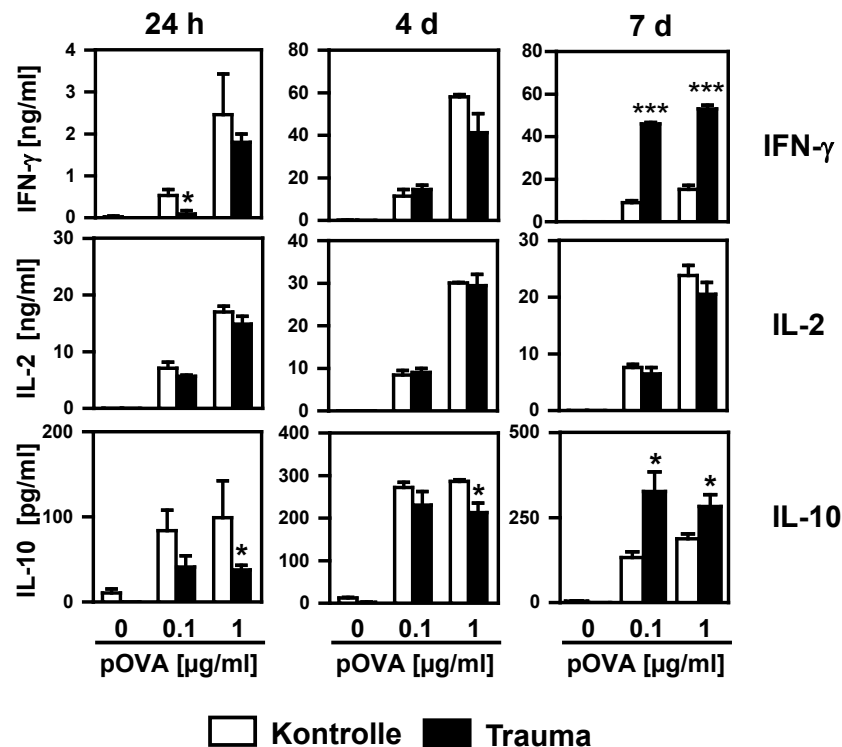


Abb. 4.32 Intramuskuläre Antigen-Applikation. Zytokin-Expression der LNC nach Restimulation. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung und Applikation der Antigen-spezifischen T-zellen, erfolgte die i.m. Injektion des Antigens. Drei Tage später wurden die LN entnommen. Eine Quantifizierung der Zytokine von IFN- γ , IL-2 und IL-10 im Überstand der restimulierten LNC erfolgte nach drei Tagen Kultur. Gezeigt werden Balkendiagramme, in denen die Zytokinmenge von LNC aus Kontroll- und Trauma-behandelten Tieren unter Berücksichtigung der Stimulationsart und des Zeitpunkts in den Überständen eines dreitägigen Assay gemessen wurde. Für jeden Zeitpunkt und jede Stimulationsart wurden die Triplikate des Assay gemittelt und mit Standardabweichung dargestellt. Es wird zu jedem Zeitpunkt ein repräsentatives Experiment aus $n = 3$ mit drei Versuchstieren pro Versuchsgruppe gezeigt. Die Unterschiede wurden mit Hilfe des ungepaarten „student t-test“ analysiert. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$.

Die IFN- γ Produktion ohne Stimulus war an allen Zeitpunkten bei den LNC aus den Kontroll- und Trauma-behandelten Tieren nicht messbar. Nach Restimulation der LNC aus Trauma-behandelten Tieren zum Zeitpunkt 24 h mit 0.1 $\mu\text{g/ml}$ pOVA produzierten diese signifikant weniger IFN- γ als die LNC der Kontrolltiere zum selben Zeitpunkt. Diese geringere IFN- γ Produktion nach Trauma war zum Zeitpunkt 4 d nicht mehr sichtbar. Sieben Tage nach i.m. Applikation zeigte sich dagegen eine deutlich größere IFN- γ Produktion gegenüber der Kontrolle. Bei einer Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ pOVA fiel die Zytokinproduktion an den gezeigten Zeitpunkten ähnlich aus.

Betrachtet man die IL-2 Messungen, so kam es zur Produktion ähnlicher Zytokinmengen in den Überständen der LNC in Kontrolle und Trauma. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied. Eine Veränderung der IL-2 Produktion war nur pOVA-konzentrationsabhängig. So wurde effektiv mehr Zytokin bei einem Stimulus von 1 µg/ml gegenüber 0,1 µg/ml pOVA erzielt. Die Ergebnisse der IL-10 Zytokinquantifizierung zeigten ein ähnliches Bild wie die der IFN- γ Messung. Eine IL-10 Produktion in Abwesenheit von pOVA war auch hier an allen Zeitpunkten bei Kontrolle und Trauma kaum messbar. Bei einer Restimulation zeigte sich in den Proben der Trauma-behandelten Gruppe nach 24 h eine geringere Produktion IL-10 als in der Kontroll-behandelten Gruppe. Diese verminderte Produktion war nach vier Tagen immer noch zu erkennen, fiel aber nicht mehr so deutlich aus. Nach sieben Tagen war auch in der IL-10 Produktion eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrolle zu erkennen. IFN- γ und IL-10 zeigten im Gegensatz zur Kontrolle 24 h nach Trauma verringerte Zytokinmengen in den Überständen. Sieben Tage nach Trauma schien sich dies zu verändern und es kam zu einer erhöhten Zytokinproduktion.

Unabhängig vom Zeitpunkt der i.m. Applikation von OVA kam es zu einer ähnlichen Proliferation und Aktivierung der OVA-spezifischen T_H-Zellen. In Abhängigkeit von der Zeit nach Trauma kam es zu einem Anstieg der IFN- γ - und IL-10-, jedoch nicht der IL-2-Produktion durch die OVA-spezifischen T-Zellen.

4.9. UMKEHR DER T_H-ZELL SUPPRESSION NACH TRAUMA ÜBER DENDRITISCHE ZELLEN IM MUSKEL

Die Antigen-spezifische T_H-Zellantwort in den poplitealen Lymphknoten traumatisierter Mäuse war entweder supprimiert (nach s.c. Applikation des Antigens) oder verstärkt (nach i.m. Applikation des Antigens) im Vergleich mit der T-Zellantwort Kontroll-behandelter Mäuse. Durch diese Kenntnis stellte sich die Frage, ob einer T_H-Zell-Suppression, wie sie nach subkutaner Applikation auftritt, durch eine vorhergehende intramuskuläre Antigen-Applikation in den traumatisierten Muskel entgegengewirkt werden kann. Um dies zu überprüfen, erhielten die Versuchstiere an Tag 4 nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung eine i.m. Applikation mit OVA und zusätzlich eine s.c. Applikation mit OVA an Tag 7. Identisch mit den vorhergehenden

Experimenten erhielten die Versuchstiere 24h vor jeder OVA-Applikation OVA-spezifische T-Zellen intravenös. Drei Tage nach subkutaner Applikation erfolgte die *in vitro* Restimulation der LNC in Kultur (s. Abb. 4.33).

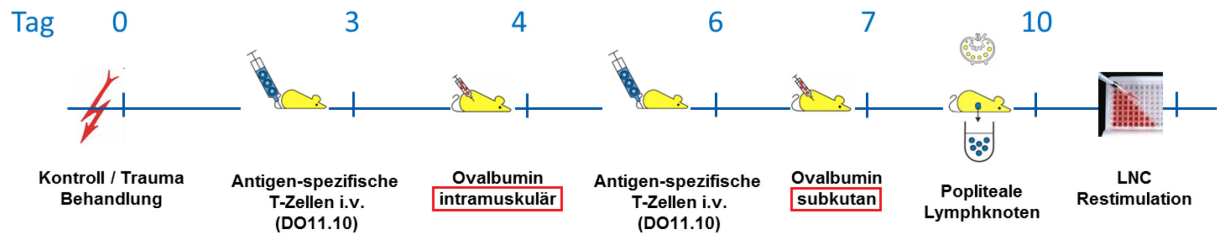


Abb. 4.33 **Umkehr der T_H -Suppression nach Trauma über Dendritische Zellen im Muskel.** Die Versuchstiere erhielten an Tag 4 nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung eine i.m. Applikation mit OVA und zusätzlich eine s.c. Applikation mit OVA an Tag 7. Identisch mit den vorhergehenden Experimenten erhielten die Versuchstiere 24h vor jeder OVA-Applikation (Tag 3 und 6 nach Trauma) OVA-spezifische T-Zellen intravenös. Drei Tage nach subkutaner Applikation (Tag 10) erfolgte die *in vitro* Restimulation der LNC in Kultur.

4.9.1. CD25 UND CD69 EXPRESSION ANTIGEN-SPEZIFISCHER T-ZELLEN IN VIVO

Um den Aktivierungszustand der T-Zellen nach Stimulation in Kultur zu ermitteln und etwaige Unterschiede in der Zytokinproduktion dadurch auszuschließen, wurden die Zellen der LN durchflusszytometrisch auf CD69 und CD25 hin untersucht. Dafür wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD69, CD25 und KJ26-1 gefärbt. Da kein Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gesehen werden konnte, wird eine graphische Darstellung dieser Ergebnisse nicht gezeigt.

4.9.2. PROLIFERATION ANTIGEN-SPEZIFISCHER T-ZELLEN *IN VIVO*

Zur Beobachtung der Proliferation der OVA-spezifischen T-Zellen wurde die Verteilung der CFSE-Markierung in den gegateten $CD4^+KJ1-26^+$ Zellen der LN betrachtet.

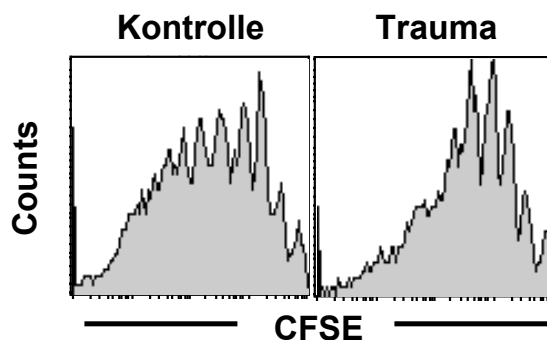


Abb. 4.34 **Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen in vivo.** An Tag 10 nach Kontroll-/ Trauma-Behandlung wurden die poplitealen LN entnommen und die LNC wurden durchflusszytometrisch auf ihre Proliferation überprüft. In Histogrammen wird die Proliferation der $CD4^+KJ1-26^+$ T_H -Zellen dargestellt. Jeder Peak in den Histogrammen stellt eine Teilung der Zellen dar. Die dargestellten Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment aus $n = 2$ mit drei Tieren pro Versuchsgruppe.

In Abb. 4.34 erkennt man sieben *Peaks* bei Kontrolle und sechs *Peaks* bei Trauma. Die Proliferationsstärke, also die Zahl proliferierter Zellen, war in der Kontroll-behandelten Gruppe ab Peak Nr. 4 etwas weiter fortgeschritten als in der Trauma-behandelten Gruppe.

4.9.3. ZYTOKIN-EXPRESSION IM ANTIGEN-SPEZIFISCHEN T-ZELL-ASSAY IN VITRO

In Abb. 4.35 wird die Quantifizierung von $IFN-\gamma$, IL-2 und IL-10 im Überstand der restimulierten Zellen nach drei Tagen Kultur gezeigt.

Die $IFN-\gamma$ Produktion ohne Stimulus war in diesem Experiment bei den Überständen der LNC aus Kontroll- und Trauma-Tieren nicht messbar. Bei einer Restimulation mit 0.1 $\mu\text{g/ml}$ -pOVA und auch bei 1 $\mu\text{g/ml}$ -pOVA zeigte sich bei den LNC der Kontrolltiere eine schwache $IFN-\gamma$ Produktion. Bei der Trauma-behandelten Gruppe zeigte sich nach Restimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ pOVA eine signifikant höhere $IFN-\gamma$ Expression der LNC gegenüber $IFN-\gamma$ Freisetzung durch LNC der Kontrollgruppe. Bei einer Stimulation mit 0.1 $\mu\text{g/ml}$ -pOVA konnte dies nicht beobachtet werden.

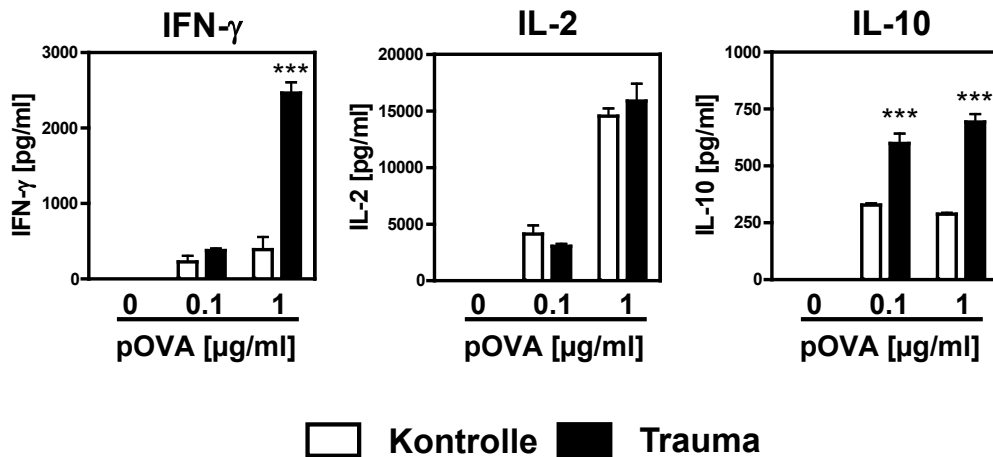


Abb. 4.35 **Subkutane mit vorhergehender intramuskulärer Antigen-Applikation. Zytokin-Expression der LNC nach Restimulation.** Gezeigt werden Balkendiagramme, in denen die Zytokinmenge von Kontrolle und Trauma unter Berücksichtigung der Stimulationsart in den Überständen eines dreitägigen Assay gemessen wurde. Für jeden Zeitpunkt und jede Stimulationsart wurden die Triplikate des Assay gemittelt und mit Standardabweichung dargestellt. Es wird zu jedem Zeitpunkt ein Experiment aus $n = 2$ mit drei Versuchstieren pro Versuchsgruppe gezeigt. *** $p < 0.001$.

Betrachtet man die IL-10 Produktion so zeigte sich, dass in der Kontroll-behandelten Gruppe bei beiden Stimulationsarten ähnlich viel IL-10 produziert wurde. Im Vergleich dazu produzierten die LNC aus Trauma-behandelten Tieren zweimal so viel Zytokin.

Bei Betrachtung der IL-2 Produktion konnte kein Unterschied zwischen der Kontroll-/ und Trauma-behandelten Gruppe festgestellt werden.

Eine Antigen-Applikation direkt ins geschädigte Gewebe wirkt somit einer nach Weichteiltrauma bestehenden T_H -Suppression entgegen.

5. DISKUSSION

Seit Jahrzehnten schon steht die immunologische Reaktion des Körpers auf ein Trauma im Fokus der klinischen Forschung. Schwerverletzte Patienten oder Patienten, die einer größeren Operation unterzogen wurden, entwickeln eine inflammatorische Reaktion, die mit Entzündungs-induziertem Multiorganversagen einhergehen kann. Zusätzlich leiden sie an einem erhöhten Risiko für infektiöse Komplikationen durch die Entwicklung einer Immunsuppression [6, 173]. Schwere Verletzungen stören dabei das Immunsystem und resultieren in einer progressiven Unterdrückung der Immunantwort. Folgen der Immunsuppression sind häufig Sepsis und das Multiorgan-Dysfunktions-Syndroms (MODS) [105].

Trotz jahrelanger Forschung ist es bisher weitestgehend unklar, welche Modulationen im Immunsystem nach Trauma stattfinden. Geeignete Ansätze zur Entwicklung von Therapien sind daher begrenzt [61]. Während die Modulation des Immunsystems nach Verletzungen, wie hämorrhagischer Schock, Fraktur oder Verbrennung, in der Vergangenheit intensiv untersucht wurde, ist nur wenig über die Folgen nach einem Weichteiltrauma bekannt, obwohl diese Art der Verletzung fast immer mit schwerem Unfall oder nach größeren Operationen der Patienten einhergeht [62, 91, 173]. Bekannt ist, dass nach Gewebeschaden zahlreiche Alarmine, wie z. B. HMGB1, HSP70, HSP90 und zelluläre RNA von apoptotischem Gewebe und durch umliegende Zellen freigesetzt werden und dadurch eine Immunreaktion über verschiedene TLR induzieren und beeinflussen können [16, 28, 30, 63, 85, 147, 158, 177]. Bisher konzentriert sich ein Großteil der Forschung auf die Rolle der Inflammation bei Trauma. Eine Untersuchung der einhergehenden Immunsuppression nach Trauma wurde oftmals vernachlässigt. Welche Rolle das isolierte stumpfe Weichteiltrauma bei der Entwicklung einer Immunsuppression nach Trauma spielt, ist unbekannt und wurde in dieser Arbeit untersucht. Dazu wurde zunächst die Pathogenese einer Weichteiltrauma-induzierten Immunsuppression näher charakterisiert und durch Trauma-modulierte Ziele im adaptiven und angeborenen Immunsystem wurden gesucht.

Um die immunologische Antwort auf das isolierte Weichteiltrauma näher zu untersuchen, wurde ein Modell gewählt, in dem OVA-spezifische T-Zellen durch

subkutane Applikation ihres spezifischen Antigens im verletzten Gewebe-drainierenden LN stimuliert wurden (s. Punkt 4.1).

Die mit der Aktivierung assoziierte Expression von CD25 und CD69 war in beiden Gruppen gleich hoch (s. Punkt 4.1.2). Die Aktivierung der T-Zellen wurde demnach durch das Trauma nicht beeinträchtigt. Die Applikation von OVA in die hintere Fußsohle induzierte die Proliferation der Antigen-spezifischen T-Zellen (s. Punkt 4.1.3). Dazu passen auch die ermittelten IL-2 Werte nach Restimulation (s. Punkt 4.1.5). Es zeigte sich, dass das autokrin auf T-Zellen wirkende IL-2 in beiden Gruppen im gleichen Maße produziert wird. Die T-Zellen scheinen nach Trauma in ihrer Fähigkeit zur Aktivierung und Proliferation nicht beeinträchtigt zu sein. Da eine fehlende Proliferation und IL-2-Sekretion der T-Zellen Zeichen einer Anergie wären [98], kann eine durch T-Zell-Anergie ausgelöste Immunsuppression somit ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse aus dem Versuch ohne Antigen-spezifische T-Zell Applikation führten zu keiner nachweisbaren Zytokinexpression (IFN- γ , IL-10, IL-2) im drainierenden LN nach Restimulation mit pOVA. Es konnte daher ebenfalls ausgeschlossen werden, dass durch die Applikation von OVA endogene Antigen-unspezifische T-Zellen aktiviert und stimuliert werden.

In der Aktivierung und Proliferation der Antigen-spezifischen T-Zellen konnte kein Unterschied zwischen der Kontroll-/ Trauma-behandelten Gruppe erkannt werden, jedoch in der Zytokinexpression zeigten sich Unterschiede. Die unter Punkt 4.1 gezeigten Daten zur Quantifizierung der Zytokine verdeutlichen, dass es nach Weichteiltrauma bereits früh (innerhalb von 24 h) zu einer anhaltenden Hemmung der Antigen-spezifischen T_H1-Polarisierung im drainierenden LN kommt im Vergleich mit der Kontroll-behandelten Gruppe (s. Punkt 4.15). Dabei war zu beobachten, dass nach *in vitro* Restimulation der LN-Zellen neben dem pro-inflammatorischen Zytokin IFN- γ auch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 in den LN der Trauma-behandelten Gruppe vermindert war. Die Applikation von OVA in die Fußsohle induziert eine Antigen-spezifischen DO11.10 T_H1-Zell Antwort in den poplitealen LN [163]. Bisher wurde IL-10 nicht mit einer T_H1 Immunantwort assoziiert. Jedoch gibt es in der Literatur Anzeichen, dass es IFN- γ ⁺IL-10⁺ T-Zellen gibt. Auch in dieser Studie war das Zytokinmuster gekennzeichnet durch die gleichzeitige Zytokinexpression von IFN- γ und IL-10 nach *in vitro* Restimulation. Hier konnte auch beobachtet werden,

dass vornehmlich IFN- γ und im geringen Maße IL-10 produziert wurden [163]. In dieser Studie wurde verdeutlicht, dass IL-12 für eine IL-10 Produktion der T_H1-Zellen benötigt wird. Dabei wird durch T-Zellen produziertes IFN- γ indirekt für eine IL-10 Produktion benötigt. Das IFN- γ wirkt dabei parakrin auf DC und induziert die IL-12 Produktion, welche im Gegenzug dann die IL-10 Produktion in T_H1-Zellen induziert. Eine weitere Studie zeigt dagegen, dass eine Co-Expression von IFN- γ und IL-10 durch T_H1-Zellen, aber auch durch regulatorische Typ 1 T-Zellen, zu einer Suppression der immunstimulierenden Funktionen von DC führt [191]. Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass es nach Trauma zu einer Hemmung der T_H1-Polarisierung kommt. Ob das IL-10, das ebenfalls nach Restimulation der Lymphknotenzellen gebildet wurde, aus Zellen stammte, die gleichzeitig IFN- γ produzierten, wurde hier nicht näher untersucht.

Betrachtet man die Literatur, so finden sich nur wenige Studien, die sich mit dem Effekt von Verletzungsmustern auf die Antigen-spezifische Immunantwort *in vivo* beschäftigen. So wurde in einer Studie zu Verbrennungsverletzungen beobachtet, dass eine Antigen-spezifische T_H-Zell Antwort in drainierenden LN von einer anfänglich erhöhten IFN- γ Sekretion zu einer verminderten IFN- γ Produktion an späteren Zeitpunkten führte nach Restimulation der Zellen mit pOVA. In dieser Studie zeigte sich zudem eine erhöhte IL-10 Produktion an den späteren Zeitpunkten [72]. Ältere Studien, die im Zusammenhang mit hämorrhagischem Schock oder Fraktur stehen, beschäftigten sich mit der mitogenen Stimulation von Milzzellen. Hier wurde eine verminderte IFN- γ Produktion beobachtet. Diese Ergebnisse gingen einher mit einer verstärkten Expression der T_H2 Zytokine IL-4 und IL-10 [1, 89, 107, 120]. Die Ergebnisse führten zu der Annahme, dass Traumata eine Verschiebung der T_H1/ T_H2 Balance induzieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch keine Verschiebung der LNC in Richtung T_H2. So konnte zwar eine verminderte T_H1- (IFN- γ) und IL-10- Antwort beobachtet werden, jedoch zeigte sich keine verstärkte Expression der T_H2 Zytokine IL-4, IL-5, IL-13. Es wird daher angenommen, dass in Abhängigkeit des Verletzungsmusters unterschiedliche Wege einer T_H1 Modulation existieren, die allesamt mit einer Reduktion des pro-inflammatorischen Zytokins IFN- γ einhergehen.

Bei der Induktion einer Verletzung beider Gastrocnemius-Muskeln war ein Antigen-spezifisches T_H1 -Zell *Priming* in den poplitealen LN vermindert, jedoch entstand dadurch keine Begünstigung einer T_H2 -Antwort. Insgesamt betrachtet, führt ein Weichteiltrauma zu einem supprimierten Immunstatus. Die Entwicklung einer solchen T_H -Zell Suppression könnte als Kompensation verstanden werden, welche eine, durch Trauma induzierte, exzessive sterile Entzündungsreaktion eindämmt. Betrachtet man jedoch die verminderte Produktion von $IFN-\gamma$ in den LNC von Trauma-behandelten Tieren, und berücksichtigt dabei die wichtige Rolle des Zytokins bei der Immunabwehr gegen zahlreiche Bakterien, so stellt sich die Frage, ob eine Weichteiltrauma-induzierte T_H1 -Suppression einer Immunabwehr gegen bakterielle Infektionen effektiv entgegenwirken kann. Seit langem ist bekannt, dass T-Zellen von schwerverletzten Patienten in ihrer $IFN-\gamma$ Sekretion stark beeinträchtigt sind [36, 99, 118]. Diese Beobachtungen wurden bei Verletzungsmustern wie hämorrhagischem Schock oder Fraktur gemacht, jedoch nicht allein bei Weichteiltrauma untersucht [1, 89, 107, 120]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine therapeutische Behandlung mit rekombinantem $IFN-\gamma$ das Überleben schwerverletzter Traumapatienten leicht verbesserte und das Risiko infektiöser Komplikationen reduzieren konnte [152]. Eine verminderte $IFN-\gamma$ Produktion nach Verletzung macht daher deutlich, wie essentiell $IFN-\gamma$ für eine effektive Immunabwehr gegen Pathogene und eine Wiederherstellung der Immunantwort nach Trauma ist.

Um einen Defekt der Lymphbahn auszuschließen, und einen damit verbundenen beeinträchtigten Transport des Antigens in den poplitealen LN als Ursache für eine verminderte Immunantwort der T-Zellen auszuschließen, wurde ein Versuchsansatz gewählt, in dem Fluoreszenz-markiertes OVA (OVA-FITC) subkutan injiziert wurde. Gleichzeitig konnte überprüft werden, ob es zu einer Aufnahme des Antigens durch APZ und Wanderung dieser in den drainierenden LN kommt. Abbildung 4.5 zeigt, dass in den LN beider Versuchsgruppen gleichgroße Mengen an OVA-FITC beladenen DC anwesend waren. Es kann daher angenommen werden, dass das Trauma die Lymphbahn nicht schädigte.

Es ist bekannt, dass ein Teil des Antigens nach s.c. Applikation in löslicher Form den LN erreicht und dort von APZ aufgenommen wird. Daher kann in diesem Versuchsansatz nicht ausgeschlossen werden, dass eine veränderte Immunantwort

erst durch eine Antigenaufnahme im LN stattfindet. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass die Initiierung einer CD4⁺ T-Zell Antwort nach subkutaner Applikation des löslichen Antigens dadurch ausgelöst wurde, dass DC das Antigen erst im LN prozessierten und präsentierten, erst danach folgten die in den LN migrierenden Antigen-beladenen DC aus der Haut [4, 82, 169]. Möglicherweise werden APZ durch Trauma derart verändert, dass sie das T_H1-*Priming* im LN hemmen. Welche APZ dazu zählen, ist jedoch unklar. Frühere Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass die *in vitro* Kultivierung Antigen-spezifischer T-Zellen mit APZ aus den LN Kontroll-/ Trauma-behandelter Tiere zu keinem Unterschied im T_H1-*Priming* führte (Daten nicht gezeigt). Das Experiment mit OVA-beladenen BMDC zeigte jedoch, dass unabhängig von möglichen Modulationen der APZ nach Trauma eine veränderte T_H1-Polarisierung stattfand.

Durch Applikation von OVA-beladenen BMDC, d. h. identische APZ wurden in Kontroll-/ Trauma-behandelte Tiere appliziert, kam es zum gleichen Ausmaß an Proliferation und Expression von Aktivierungsmarkern der T_H-Zellen im LN (s. Abb. 4.8 + 4.9). Im Vergleich zu einer Applikation mit löslichem OVA gab es insgesamt eine geringere Menge an DO11.10 Zellen im LN. Eine mögliche Ursache hierfür liegt möglicherweise an der Zahl der injizierten BMDC (1×10^5) und an einer möglichen relativ geringen Menge an BMDC, die den LN erreichen. Dadurch bedingt sinkt die Anzahl möglicher APZ/ T-Zell Kontakte und eine T-Zell Proliferation fällt dementsprechend kleiner aus. Die Zahl der injizierten BMDC wurde so gewählt, dass sie in etwa die Zahl residierender DC widerspiegelte. Es konnte in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied in der Proliferation zwischen der Kontroll- und Trauma-behandelten Gruppe beobachtet werden.

Nach subkutaner Gabe von OVA-beladenen BMDC sezernierten restimulierte LNC von Tieren der Traumagruppe 1.5-fach mehr IFN- γ als LNC von Kontrolltieren (s. Abb. 4.10). Die subkutane Applikation von BMDC aus naiven Tieren führte demnach zu einer verstärkten Immunantwort in Trauma-behandelten Tieren. Dies liefert den Hinweis, dass es zu einer Modulation der APZ kommt. Ein möglicher Grund hierfür könnte das lokale Milieu nach Trauma sein. Dieses könnte einen unterschiedlichen Effekt auf residierende DC im LN im Gegensatz zu den *in vitro* generierten BMDC haben. Eine Studie von 2010 zeigte zwar, dass residierende DC

und aus Monozyten-differenzierten DC (wie die BMDC) bei Entzündungsprozessen im gleichen Maße IL-12 sezernieren können, jedoch beruht dies auch auf unterschiedlichen Signalwegen [199]. Dass APZ nach Trauma moduliert werden, zeigen diverse Studien. Eine Studie von 2011 zeigt, dass regulatorische T-Zellen eine Verbrennungs-bedingte Immunantwort supprimieren, indem sie die Reaktivität von APZ kontrollieren [106]. In einer weiteren Studie von KAWASAKI et al. wurde deutlich, dass DC 2 h nach Trauma und Hämorrhagischen Schock eine verminderte Zytokinexpression aufwiesen [86]. ANGELE et al. vermuten, dass T-Zellen nach Hämorrhagie eine APZ Antwort supprimieren, indem über eine verminderte IFN- γ Produktion der T-Zellen APZ gehemmt werden [184]. Demgegenüber steht eine Studie von 2009, in der keine beeinträchtigte DC Antigen-Präsentation an CD4⁺ T-Zellen nach Verbrennung beobachtet werden konnte [66]. Auch bei Betrachtung einer Modulation von APZ nach Trauma zeigt die Literatur gegensätzliche Arbeiten. Dies zeigt, dass unterschiedliche Verletzungsmuster sich verschieden auf das Immunsystem auswirken. Ob nach Weichteiltrauma lösliche oder zelluläre Faktoren eine Modulation der OVA-beladen BMDC induzieren, bleibt unklar.

Das Weichteiltrauma induziert innerhalb von 24 h eine anhaltende Suppression der T_H1-Polarisierung. Für die Mechanismen, die früh nach Trauma zu einer Hemmung der T_H-Zell-Polarisierung führen könnten, spricht zum einen die Wirkung von löslichen zirkulierenden Mediatoren, die rasch nach Trauma in den LN gelangen könnten. Lösliche zirkulierende Mediatoren könnten z. B. endogene Rezeptor-Antagonisten oder lösliche Zytokinrezeptoren sein, wie *soluble TNF-receptor* (sTNF-R) oder IL-1R, die nach Trauma vermehrt sezerniert werden [38, 56]. Diese wirken einer pro-inflammatorischen Antwort entgegen und könnten an der Hemmung der T_H1-Polarisierung im LN nach Trauma beteiligt sein. Des Weiteren könnten endogene Alarmine an einer Immunsuppression beteiligt sein. Betrachtet man die Literatur, so findet sich wenig über eine immunsuppressive Funktion von Alarminen. So weiß man, dass HSP60 und HMGB-1 eine Hemmung der T_H-Zell Antwort über die Aktivierung von Treg induzieren können [80, 198]. MAJETSCHAK et al. berichten, dass extrazelluläres Ubiquitin passiv nach Gewebeschaden freigesetzt wird und anti-inflammatorisch in Trauma und bei Sepsis wirkt [110, 111]. Der früh auftretende Mechanismus, der dieser sehr schnellen Induktion der Trauma-induzierten T_H1-Suppression zugrunde liegt, bleibt unklar. Auffällig ist jedoch, dass das suppressive

Milieu im LN auch sieben Tage nach Trauma noch vorliegt. Es ist eher unwahrscheinlich, dass lösliche Mediatoren, die initial nach Trauma sezerniert wurden, über einen Zeitraum von sieben Tagen aktiv bleiben. Die lang anhaltende Suppression im LN spricht eher für einen Zell-vermittelten Effekt. Es wurden daher potentielle Ziele von Trauma im adaptiven und angeborenen Immunsystem gesucht und näher charakterisiert.

In einem ersten Versuchsansatz wurde die Modulation endogener T-Zellen, als Teil des adaptiven Immunsystems, in den drainierenden LN untersucht. Die Transferversuche zeigten, dass T-Zellen aus den LN von Tieren nach Trauma eine T_H1 -Polarisierung von OVA-spezifischen T-Zellen in naiven Tieren hemmen. Die Proliferation und Aktivität der OVA-spezifischen T-Zellen wurde dabei nicht beeinträchtigt (s. Abb. 4.12 + 4.13). Demnach könnten endogene T-Zellen aus Trauma-behandelten Tieren eine regulierende Funktion übernehmen und weitere T-Zellen hemmen. Wie zuvor erwähnt, sind verschiedene regulatorisch wirkende T-Zellen, die die Aktivierung anderer T-Zellen hemmen, nach Trauma bekannt [106, 132]. $Foxp3^+$ regulatorische T-Zellen exprimieren CD25 und den Transkriptionsfaktor Foxp3 und hemmen die Aktivität von anderen Immunzellen [138, 166]. Die Analyse der T-Zellen aus dem LN nach Trauma zeigte jedoch keinen erhöhten Anteil an $Foxp3^+CD4^+CD25^+$ T-Zellen oder eine erhöhte IL-10 oder TGF- β Produktion der T-Zellen. Eine Beteiligung von $Foxp3^+$ Treg bei der Weichteiltrauma-induzierten Hemmung im LN ist eher unwahrscheinlich. Ein Experiment in dem eine *in vivo* Depletion von Treg möglich ist, wie im DEREK-Mausmodell [94], würde jedoch Gewissheit bringen und zeigen, ob supprimierend wirkende Treg an einer Hemmung des T_H1 -*Priming* im LN nach Weichteiltrauma beteiligt sind.

Da den endogenen T-Zellen nach Trauma eine hemmende Funktion zugeordnet werden konnte, wurde ein weiterer Versuchsansatz gewählt, um den Einfluss endogener T-Zellen nach Trauma weiter zu charakterisieren und deren Einfluss auf die Modulation der Antigen-spezifischen T-Zellen zu untersuchen. Im Experiment mit $RAG-2^{-/-}$ Mäusen (s. Abb. 4.14) zeigte sich, dass der Verlust von endogenen B-/ T-Zellen in unserem Modell zu einer verstärkten IFN- γ Immunantwort der Antigen-spezifischen T-Zellen nach Trauma-Induktion führte (s. Punkt 4.16). Die zuvor gezeigte Suppression des Antigen-spezifischen T_H1 -*Priming* nach Trauma wurde

durch das Fehlen endogener T-Zellen aufgehoben. Vielmehr stellte der einmalige Transfer endogener T-Zellen in RAG-2^{-/-} Mäuse vor Induktion des Traumas, die Hemmung der T_H1-Polarisierung in den Antigen-spezifischen T-Zellen wieder her. Dieses Ergebnis zeigt, dass endogene T-Zellen tatsächlich an einer Antigen-spezifischen T-Zell Hemmung nach Weichteiltrauma beteiligt sind. Ob es sich dabei um eine direkte Hemmung durch die endogenen T-Zellen oder einen indirekten Effekt über weitere Zellen handelt, ist unklar. Fakt ist, dass es früh nach Weichteiltrauma (innerhalb 24 h) zu einer Modulation von naiven T-Zellen kommt, welche mit einer suppressiven Wirkung einhergeht. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob es sich dabei um einen lokalen Effekt der endogenen T-Zellen im das verletzte Gewebe drainierenden LN handelt, oder ob auch T-Zellen aus anderen lymphoiden Organen supprimierend wirken können.

In einem *in vitro* APZ/ T-Zell Assay wurde die *in vivo* gesehene Immunsuppression und Hemmung der Antigen-spezifischen T-Zellen durch endogene T-Zellen nicht beobachtet. Im Experiment führte eine stimulierte Co-Kultur aus APZ, Antigen-spezifischen T-Zellen und T-Zellen aus Kontroll- oder Trauma-behandelten Tieren zu keinem Unterschied in der T_H1-Polarisierung der Antigen-spezifischen T-Zellen (s. Abb. 4.19). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass *in vivo* neben endogenen T-Zellen ein weiterer Faktor, möglicherweise in Form eines löslichen Mediators oder von akzessorischen Zellen, an der Weichteiltrauma-induzierten T_H1-Suppression beteiligt ist.

Als möglicher Kandidat für eine akzessorische Zelle wurde die Rolle von NK/ NKT-Zellen in der Interaktion zur Entstehung der T_H-Zell Suppression nach Weichteiltrauma untersucht. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, stehen NK-/ NKT-Zellen in engem Kontakt mit APZ und auch T-Zellen in inflammatorischen Geweben und LN.

Aufgrund der regulierenden Funktion von NK-/ NKT-Zellen und dem engen Kontakt zwischen NK-/ NKT-Zellen und T-Zellen bzw. DC in LN erfolgten in dieser Arbeit Versuche mit NK-/ NKT-Zell-Depletion (s. Abb. 4.17). Diese Versuche zeigten, dass Antigen-spezifische T-Zellen aus LN von Trauma-behandelten Tieren vermehrt IFN- γ sezernieren, wenn zuvor die NK-/ NKT-Zellen mittels Anti asialo Serum aus den LN depletiert worden waren (s. Abb. 4.23). Da das Anti asialo Serum sowohl NK- als

auch NKT-Zellen depletiert, bleibt unklar, welcher der beiden Zelltypen für den hemmenden Effekt verantwortlich ist. Einer Studie von BARKHAUSEN et al. zufolge, kommt es nach NK-Zell-Depletion im Polytraumamodell zu einer verminderten systemischen Entzündungsantwort, gezeigt durch einer verringerte IL-6 Expression in der Leber und einer Reduktion an Leber und Lunge infiltrierenden Neutrophilen [11]. Ob es nach NK-Zell-Depletion im Weichteiltrauma-Modell zu ähnlich veränderten systemischen Parametern kommt, ist unklar, da in der eigenen Arbeit nur eine Interaktion von NK-Zellen lokal im drainierenden LN untersucht wurde. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von NKG2A (inhibierend) und NKG2D (aktivierend) auf NK-Zellen der Kontroll-/ Trauma-behandelten Gruppe untersucht. Die Expression dieser Moleküle zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen den NK-Zellen der Kontroll- und Trauma-behandelten Gruppe (s. Abb. 4.24). Eine Rolle dieser Oberflächenmoleküle bei der Entstehung der gehemmten T_H1 -Polarisierung der Antigen-spezifischen T-Zellen wird daher ausgeschlossen.

Neben der direkten Interaktion von NK-Zellen und DC in geschädigten Geweben [128], gibt es auch eine direkte Interaktion mit B-/T-Zellen in drainierenden LN. So kann von NK-Zellen produziertes $IFN-\gamma$ direkt ein $CD4^+$ T-Zell *Priming* induzieren [115, 127]. In einer Studie über *Leishmania major* Infektion konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen schnell in den LN rekrutiert werden, wo sie in engem Kontakt zu DC und Antigen-spezifischen T-Zellen gefunden wurden, um eine T_H1 -Polarisation zu fördern [8]. Weiterhin können NK-Zellen negativ regulieren, indem sie aktivierte T-Zellen abtöten, solange die T-Zellen nicht genug klassische oder nicht-klassische MHC-Klasse-I Moleküle exprimieren [101]. Daneben können NK-Zellen auch durch Zellzyklus-Arrest reversibel die klonale T-Zell-Expansion supprimieren [181]. Diese regulierende Funktion von NK-Zellen ist im gezeigten Modell eher unwahrscheinlich, da keine beeinträchtigte Proliferation und Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zellen beobachtet wurde (s. Punkt 4.5.1). Ein früh nach Trauma entstehender Kontakt von NK-Zellen, APZ und endogenen T-Zellen im drainierenden LN ist wahrscheinlich. Es wird daher nicht ausgeschlossen, dass es dabei zu einer Modulation von einer oder auch mehrerer Zellpopulationen kommt.

Die Rolle von NKT-Zellen im Zusammenhang mit Immunmodulationen durch Verletzungen wurde bisher nicht umfassend untersucht. Eine Studie über NKT-Zellen während der Immunantwort in einem murinen dorsalen Verbrennungsmodell von FAUNCE et al zeigt, dass in mit anti-CD1d-blockierenden Antikörpern vorbehandelten Mäusen die aus der Milz isolierten NKT-Zellen 24 h nach Verbrennung eine erhöhte Produktion von IL-4 und eine verringerte Produktion von IFN- γ zeigten [57]. Dies korreliert mit der verletzungsbedingten Suppression der T-Zell-Immunität. Dies lässt vermuten, dass die Suppression der T-Zell vermittelten Immunität nach Verbrennung durch CD1d-restrikte invariante NKT-Zellen geschieht. Eine weitere Studie bestätigt, dass die Gruppe der CD1d-restrikten invarianten NKT-Zellen für die T-Zell-Suppression nach Verbrennung verantwortlich sind [182]. In dieser Studie wird weiter spekuliert, dass NKT-Zellen möglicherweise die periphere CD4-T-Zell-Immunität nach Verbrennung unterdrücken und dies nicht nur durch die direkte Suppression der CD4-T-Zell-Funktion, sondern auch durch ihre Wirkung auf APZ durch negative Regulation der Expression von MHC- und co-stimulatorischen Molekülen [182]. Eine Modulation durch NKT-Zellen ist auch in dem hier gezeigten Weichteiltrauma-Modell möglich, kann aber nicht bewiesen werden, da NK- und NKT-Zellen bei der Behandlung mit Anti asialo Serum nicht getrennt voneinander depletiert werden können.

Insgesamt gesehen besitzen NK-/ NKT-Zellen das Potenzial positiv und negativ regulierend zu wirken. Sie besitzen damit die Fähigkeit, fördernd oder hemmend auf eine Immunantwort nach schweren Verletzungen zu reagieren. Die frühe Interaktion von DC, NK-Zellen und T-Zellen stellt eine wichtige Triade dar, um eine Immunreaktion zu fördern, zeigt aber auch, dass eine frühe Modulation nach Trauma möglich ist. Es wird vermutet, dass auch NK-Zellen an einer Antigen-spezifischen T-Zell Hemmung nach Weichteiltrauma beteiligt sind. Auch hier konnte nicht geklärt werden, ob es sich dabei um eine direkte Hemmung der T_H1-Polarisierung durch NK-Zellen handelt oder ob NK-Zellen möglicherweise die endogenen T-Zellen modulieren. Welche Modulatoren, welcher zeitliche Verlauf, sowie welche Reihenfolge der Modulation nach Trauma eine Rolle spielt, bleibt daher unklar.

Nach Weichteiltrauma sind sowohl Zellen des adaptiven (T-Zellen) als auch des angeborenen (NK-/ NKT-Zellen, APZ) Immunsystems an der Entwicklung einer

T_H -Zell Hemmung beteiligt. Die Untersuchungen zeigen nur die lokale Hemmung der T_H1 -Polarisierung. Unklar ist jedoch, ob es auch systemisch zu einer Hemmung kommt. Da bekannt ist, dass NK-Zellen an der Beseitigung von Sekundärinfektionen in der Lunge maßgeblich beteiligt sind [42, 190], IFN- γ essentiell für die Bekämpfung einer Infektion ist, wurde ein *in vivo* Lungeninfektionsmodell betrachtet (s. Abb. 4.25). Dadurch kann geprüft werden, ob es zu einer systemischen Immunsuppression nach Weichteiltrauma kommt, was wiederum eine klinische Relevanz dieser Verletzung verdeutlichen würde.

Die Induktion eines Traumas der Gastrocnemius-Muskeln führte zu einer verschlechterten Immunabwehr gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* in der Lunge (s. Abb. 4.26). Die Elimination von *Pseudomonas aeruginosa* erfolgt über das angeborene Immunsystem. Die erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* nach Weichteiltrauma weist darauf hin, dass diese Verletzung nicht nur lokal, sondern auch systemisch die Funktion des angeborenen Immunsystems unterdrückt. In der Literatur finden sich nur wenige Maus-Studien, die sich mit Sekundärinfektionen der Lunge und deren verschlechterte Abwehr nach Trauma befassen. Darunter fallen z. B. Studien mit Toxin-induzierten Gewebeschäden, Laparatomie oder Thorax-Trauma [79, 113, 155]. Eine verschlechterte bakterielle Beseitigung in den Lungen ist allen Trauma-Modellen gemein. Welche Zellen nach Weichteiltrauma die erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* vermitteln, bleibt unklar.

Im Rahmen einer Dissertation in unserer Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass neben Monozyten/ Makrophagen auch DC sequentiell in geschädigtem Muskelgewebe erscheinen. Um die Pathogenese der Immunmodulation nach Weichteiltrauma weiter zu charakterisieren, wurde die Rolle der APZ im geschädigten Muskel näher untersucht. Es wurde bereits dargestellt, dass OVA-beladene aus dem Knochenmark-generierte BMDC die T_H -Zell Antwort im drainierenden LN wiederherstellen. Daher stellte sich die Frage, ob den Muskel infiltrierende DC, welche vornehmlich aus Blutmonozyten differenzieren, vergleichbar mit aus Knochenmark-generierten BMDC eine Immunantwort im drainierenden LN beeinflussen können.

Eine verstärkte Infiltration von DC fand ab einem Zeitpunkt 4 Tage bis 7 Tage nach Trauma statt (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen der Reparatur- und Regenerationsmechanismen sind seit längerem bei Wundheilungen bekannt [55]. Arbeiten, die sich mit Toxin-induzierten Gewebeschäden beschäftigten, konnten ähnliche Ergebnisse in der Kinetik und Sequenz der Infiltration beobachten [178]. Im Kontext mit Wundheilungen konnte diesen DC bislang noch keine Funktion zugeordnet werden. Die in der hier vorliegenden Arbeit erfolgte Charakterisierung der DC zeigte, dass von Tag 4 bis zu Tag 7 nach Trauma die Expression von CD40 und CD86 auf den DC kontinuierlich anstieg (s. Abb. 4.28 B). Außerdem verfügten die DC im geschädigten Muskel über große Mengen an MHC-Klasse-II Molekülen auf ihrer Oberfläche (s. Abb. 4.28 A), die charakteristischen Eigenschaften von APZ. Im Gegensatz dazu exprimierten residierende DC im unbehandelten Muskel nur geringe Mengen der co-stimulatorischen bzw. MHC-Klasse-II Moleküle.

Es ist bekannt, dass Blutmonozyten unter inflammatorischen Konditionen zu DC differenzieren können und in geschädigte Gewebe einwandern [68]. In einer Studie von BRIGITTE et al. konnte gezeigt werden, dass in C57BL/6 Mäusen nach Toxin-induzierter Gewebeverletzung eine Infiltration von Monozyten ins geschädigte Gewebe stattfand. Dabei fand man heraus, dass es zum Zeitpunkt 7 d nach Eingriff zur verstärkten Expression von CD11c kam, jedoch wenige Zellen CD86 exprimierten [24]. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit den gezeigten in dieser Arbeit. In der vorliegenden Arbeit schien das lokale Milieu im geschädigten Gewebe aktivierend auf DC zu wirken.

Neben Komponenten pathogener Herkunft sind auch pro-inflammatorische Zytokine, wie $\text{TNF-}\alpha$ oder $\text{IFN-}\gamma$, bekannt für die Induktion der Reifung von DC [10, 65, 117]. Da es sich in diesem Modell um ein steriles stumpfes Weichteiltraum handelt, kann eine Beteiligung pathogener Komponenten bei der Induktion einer DC Reifung im verletzen Gewebe ausgeschlossen werden. Studien mit Toxin- oder Kälte-induzierter Verletzung zeigten erhöhte Mengen an $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ im Muskel [31, 33, 187]. In der vorliegenden Arbeit wurde dies nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Vielmehr zeigte der Versuchsansatz mit $\text{IFN-}\gamma$ -/- Mäusen, dass nach Weichteiltrauma ähnlich viele DC den Muskel infiltrierten und im gleichen Maße reifen konnten (s. Abb. 4.29). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Reifung von DC in verletzen

Gewebe unabhängig war von $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$. Der Ursprung dieser DC Reifung bleibt weiterhin unklar, könnte aber z. B. auf Alarmine zurückzuführen sein.

Wie bereits beschrieben, werden nach Gewebeschaden zahlreiche DAMP freigesetzt, die über PRR auf Zielzellen eine modulierende Wirkung ausüben. So gibt es viele endogene Alarmsignale, die eine Aktivierung von DC und anderen APZ als Folge haben. Zu diesen Alarmine gehören z. B. HSP. HSP liegen normalerweise in den Zellen als molekulare Chaperone vor, die eine korrekte Faltung von Proteinen kontrollieren. Wird eine Zelle nekrotisch oder Stress ausgesetzt, werden HSP freigesetzt und aktivieren Zellen des angeborenen Immunsystems über Bindung an einen oder mehrere TLR [136]. Es konnte gezeigt werden, dass α A-Crystallin und HSPB8 beide über TLR4 DC aktivieren können [159]. Weiterhin konnte in einer Studie gezeigt werden, dass das HSP gp96 synergistisch mit LPS DC aktiviert und eine DC-induzierte T-Zell Antwort auslöst [186]. HSP können mit Peptiden Komplexe bilden und von APZ durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden [12, 97]. Dieser HSP-Peptid-Komplex kann dann T-Zellen präsentiert werden, und kann im Gegensatz zu einer Präsentation von Antigen-Peptiden allein, eine verstärkte T-Zell Aktivierung induzieren [13, 97].

Ein weiterer endogener Mediator nach Gewebeschaden ist Heparansulfat. Heparansulfat gehört zur Gruppe der Glykosaminoglykane und befindet sich in der Membran von Zellen [151]. JOHNSON et al. fanden heraus, dass DC unter Stimulation mit Heparansulfat verstärkt reifen. Deutlich wurde dies durch die Expression co-stimulatorischer Moleküle und die Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren [84].

Weitere DC aktivierende Mediatoren, die man nach Verletzung findet, sind z. B. Hyaluronsäure [176], β -Defensin-1-2 [17, 18], *eosinophil-derived neurotoxin* (EDN) [192, 193], HMGB1 [144], Harnsäure [167] und doppelsträngige DNA [81]. Bei vielen weiteren immunstimulierenden Molekülen, wie S100 Proteinen [76, 161], Nukleosomen [46, 74], Purinen (ATP und Adenosin) [41], Antimikrobiellen Peptiden [197] und mitochondrialen DAMP [201] ist eine Freisetzung und Beteiligung in der Nekrose-induzierten Inflammation *in vivo* unbekannt, wird aber nicht ausgeschlossen. Die Literatur zeigt, dass die Palette an die DC-Reifung induzierenden Alarminen nach Verletzung zahlreich ist. Dass diese Alarmine auch in dem hier untersuchten Modell für Weichteiltrauma freigesetzt werden, ist naheliegend, aber nur zum Teil bewiesen.

So konnte durch unsere Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen werden, dass kurz nach Weichteiltrauma Mediatoren wie S100 (nicht veröffentlicht) und auch HSP [62] freigesetzt werden. Die Reifung der DC im traumatisierten Muskel könnte durch oben erwähnte Alarmine vermittelt werden.

Die Beobachtung, dass im traumatisierten Muskel eine Vielzahl von DC mit hoher Expression von co-stimulatorischen Molekülen vorliegen, und dass durch Alarmine (z. B. HSP) DC möglicherweise eine T-Zell Aktivierung im LN verstärken (s. oben), führte zu der Idee, dass ein in den traumatisierten Muskel appliziertes Antigen ähnlich der intramuskulären Vakzinierung [52] eine Immunantwort im drainierenden LN verändert. Voraussetzung für solch eine DC-vermittelte T-Zell Aktivierung nach i.m. Applikation ist, dass das Antigen von DC im Muskel aufgenommen und in den drainierenden LN transportiert wird. So konnte gezeigt werden, dass eine Applikation von OVA-FITC in den Muskel zu einer Ansammlung von OVA-FITC⁺ DC im LN führte (Daten nicht gezeigt). Demnach induzierte das OVA eine Migration von DC aus dem Muskel in den LN. Eine Spontanmigration der DC in den LN konnte ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass ein Großteil der DC, welche im verletzten Gewebe unter sterilen Bedingungen erscheinen, erst durch die Interaktion mit Komponenten pathogener Herkunft aktiviert werden und daraufhin das Antigen in den drainierenden LN transportieren. Dies steht im Gegensatz zu einer Infektions-bedingten Rekrutierung von aus Monozyten-differenzierten DC, die durch einen infektiösen Auslöser in das verletzte Gewebe infiltrieren, zeitgleich das Antigen aufnehmen und in den LN transportieren [95].

Nach Applikation von OVA in den Gastrocnemius-Muskel von Kontroll-/ Trauma-behandelten Tieren wurde die Proliferation und Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zellen untersucht. Hier zeigte sich eine vergleichbare Proliferation und Aktivierung von OVA-induzierten T-Zellen im drainierenden LN (s. Abb. 4.30 + 4.31).

Bei der Zytokinquantifizierung in den Kulturüberständen ließ sich in der Trauma-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe eine ansteigende IFN- γ Produktion der LNC nach Restimulation an Tag 7 um das 5-fache erkennen (s. Abb. 4.32). Der Anstieg der IFN- γ und IL-10 Produktion von T-Zellen aus Trauma-behandelten Tieren im Vergleich zu Kontroll-behandelten Tieren im Verlauf von Tag 1 bis 7 nach Trauma korrelierte mit dem Erscheinen von DC im geschädigten Muskel und mit deren

ansteigendem Reifungsgrad. Diese Ergebnisse sprechen für einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von DC im traumatisierten Muskel und der Zytokin-Expression im LN und unterstützen die Annahme, dass aktivierte DC im traumatisierten Muskel das Antigen aufnehmen, in den LN wandern und dort eine verstärkte Antigen-spezifische T-Zell Antwort induzieren können.

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich gegensätzliche T_H-Zell Antworten nach Trauma im selben LN entwickeln können. Dies war abhängig von dem Ort der Antigen-Applikation. So führte eine subkutane OVA-Applikation zu einer supprimierten T_H1-Polarisierung, wohingegen die Gabe des Antigens in das verletzte Gewebe zu einer verstärkten T_H1-Polarisierung führte. Möglicherweise kann eine vorherige Gabe des Fremdan Antigens über das geschädigte Gewebe einer T_H-Zell Suppression entgegenwirken. Die Zellen, insbesondere die DC im traumatisierten Gewebe, könnten als „endogenes Adjuvans“ wirken und die durch das Trauma supprimierten T-Zellen in den lymphatischen Organen reaktivieren.

Im Versuchsansatz (s. Punkt 4.9) konnte so gezeigt werden, dass eine intramuskuläre OVA-Applikation an Tag 4 nach Trauma die supprimierte T_H1-Polarisierung verhinderte, die sonst nach subkutaner Antigen-Applikation in die Fußsohle auftrat. Es wird daher vermutet, dass DC nach intramuskulärer Injektion eines Antigens in den LN wandern. Wie oben erwähnt, sind endogene T-Zellen und NK-Zellen über einen bislang unbekannten Mechanismus an der Entstehung der T_H-Zell Suppression beteiligt. Möglicherweise interagieren die aus dem Muskel stammenden DC mit den T- oder NK-Zellen und verhindern deren hemmende Wirkung auf die Antigen-spezifischen T-Zellen. Diese Funktion der DC im verletzten Gewebe könnte möglicherweise dazu dienen, den Körper auf eine schnelle Einleitung einer Immunantwort bei Infektion im geschädigten Bereich vorzubereiten.

DC im geschädigten Muskel könnten somit tatsächlich als „endogenes Adjuvans“ fungieren und einer T_H-Zell Suppression entgegenwirken.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Interaktion zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem gewährleistet einen wirksamen Schutz vor Infektionen. Polytrauma-Patienten entwickeln oft eine Immunsuppression, die mit infektiösen Komplikationen einhergeht. Während eines Traumas kommt es zu einer Dysbalance des T_H1/T_H2 Gleichgewichts und zu einer Hemmung von Zellen des angeborenen Immunsystems. Die Rolle des Weichteiltraumas bei der Entwicklung einer Immunsuppression ist weitestgehend unbekannt und wurde in dieser Arbeit näher untersucht.

Durch Induktion eines sterilen stumpfen Weichteiltraumas beider Gastrocnemius-Muskeln konnte die Entstehung einer Immunsuppression beobachtet werden. Gezeigt werden konnte dies durch eine verschlechterte Abwehr einer *Pseudomonas aeruginosa*-vermittelten Infektion in der Lunge nach Weichteiltrauma, sowie durch die Hemmung der Antigen-spezifischen T_H1 -Polarisierung im drainierenden LN. Diese Hemmung war bereits einen Tag nach Trauma zu erkennen und hielt mindestens 7 Tage an. Dabei konnte die Beteiligung von endogenen T-Zellen, sowie NK-Zellen an der Suppression der T_H1 -Polarisierung nach Weichteiltrauma nachgewiesen werden.

Nach Trauma erschienen DC im verletzten Gewebe. Diese DC wiesen eine erhöhte Expression von MHC-Klasse-II- und co-stimulatorischen Molekülen auf. Eine Antigen-Applikation in den Muskel induzierte eine verstärkte T_H1 -Polarisierung im LN. Dabei korrelierte das Ausmaß der verstärkten T_H -Zell-Antwort mit der Expression co-stimulatorischer Moleküle auf den DC im geschädigten Muskel.

Die Präsentation des Antigens nach intramuskulärer Applikation konnte in den bisher unbekannten Mechanismus, der für eine supprimierte T_H1 -Polarisierung in den LN verantwortlich ist, eingreifen und somit der T_H -Zell Suppression entgegenwirken. Daher könnten DC als „endogenes Adjuvans“ im Rahmen einer Therapie der Immunsuppression nach Trauma genutzt werden, indem geeignete Stimuli in das traumatisierte Gewebe appliziert werden, um die Funktion der T_H -Zellen wiederherzustellen. Dadurch könnte sich das Risiko für infektiöse Komplikationen nach Trauma verringern.

Die in dieser Arbeit beschriebenen pathophysiologischen und immunologischen Folgen eines Weichteiltraumas machen deutlich, wie wichtig es ist, neben rapider

und adäquater Wundversorgung, Einleitung geeigneter Schritte für elektive Eingriffe (Minimalinvasiv) und post-traumatischem Immunmonitoring, einen geeigneten Ansatz für immunstimulierende und immunmodulierende Therapien zu entwickeln. Die Überlebenschancen von schwerverletzten Patienten auf Intensivstationen würden sich durch immunmodulierende Therapiemöglichkeiten stark verbessern.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abraham E, Chang YH (1992) Haemorrhage-induced alterations in function and cytokine production of T cells and T cell subpopulations. *Clin Exp Immunol* 90:497-502
2. Ada G (1994) Twenty years into the saga of MHC-restriction. *Immunol Cell Biol* 72:447-454
3. Akira S, Hemmi H (2003) Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 85:85-95
4. Allenspach EJ, Lemos MP, Porrett PM, Turka LA, Laufer TM (2008) Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells. *Immunity* 29:795-806
5. Altfeld M, Fadda L, Frleta D, Bhardwaj N (2011) DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat Rev Immunol* 11:176-186
6. Angele MK, Faist E (2002) Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 6:298-305
7. Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER (2005) Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. 1985. *J Immunol* 175:4163-4165
8. Bajenoff M, Breart B, Huang AY, Qi H, Cazareth J, Braud VM, Germain RN, Glaichenhaus N (2006) Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med* 203:619-631
9. Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA (2009) Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol* 129:1628-1642
10. Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252
11. Barkhausen T, Frerker C, Putz C, Pape HC, Krettek C, van Griensven M (2008) Depletion of NK cells in a murine polytrauma model is associated with improved outcome and a modulation of the inflammatory response. *Shock* 30:401-410
12. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK (2001) CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14:303-313
13. Bendz H, Ruhland SC, Pandya MJ, Hainzl O, Riegelsberger S, Brauchle C, Mayer MP, Buchner J, Issels RD, Noessner E (2007) Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling. *J Biol Chem* 282:31688-31702
14. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK (2007) Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 19:652-657

15. Bianchi ME (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81:1-5
16. Bianchi ME, Manfredi AA (2009) Immunology. Dangers in and out. *Science* 323:1683-1684
17. Biragyn A, Surenhu M, Yang D, Ruffini PA, Haines BA, Klyushnenkova E, Oppenheim JJ, Kwak LW (2001) Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol* 167:6644-6653
18. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakawa AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ, Kwak LW (2002) Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 298:1025-1029
19. Black R, Kronheim S, Sleath P, Greenstreet T, Virca GD, March C, Kupper T (1991) The proteolytic activation of interleukin-1 beta. *Agents Actions Suppl* 35:85-89
20. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology* 15:749-795
21. Bone RC (1996) Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 24:1125-1128
22. Boussiotis VA, Freeman GJ, Gray G, Gribben J, Nadler LM (1993) B7 but not intercellular adhesion molecule-1 costimulation prevents the induction of human alloantigen-specific tolerance. *J Exp Med* 178:1753-1763
23. Brenck F, Hartmann B, Mogk M, Junger A (2008) [Scoring systems for daily assessment in intensive care medicine. Overview, current possibilities and demands on new developments]. *Anaesthesist* 57:189-195
24. Brigitte M, Schilte C, Plonquet A, Baba-Amer Y, Henri A, Charlier C, Tajbakhsh S, Albert M, Gherardi RK, Chretien F (2010) Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notoxin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum* 62:268-279
25. Brochner AC, Toft P (2009) Pathophysiology of the systemic inflammatory response after major accidental trauma. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 17:43
26. Castriconi R, Della Chiesa M, Moretta A (2004) Shaping of adaptive immunity by innate interactions. *C R Biol* 327:533-537
27. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J (1994) Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180:1263-1272
28. Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL (2008) TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med* 205:2609-2621
29. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9:10-16

30. Chen GY, Tang J, Zheng P, Liu Y (2009) CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science* 323:1722-1725
31. Chen SE, Gerken E, Zhang Y, Zhan M, Mohan RK, Li AS, Reid MB, Li YP (2005) Role of TNF- α signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C1179-1187
32. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM (2003) Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886
33. Cheng M, Nguyen MH, Fantuzzi G, Koh TJ (2008) Endogenous interferon- γ is required for efficient skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C1183-1191
34. Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB (2004) What is transforming growth factor- β (TGF- β)? *Br J Plast Surg* 57:215-221
35. Choi S, Schwartz RH (2007) Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. *Semin Immunol* 19:140-152
36. Christou NV, Meakins JL, Gordon J, Yee J, Hassan-Zahraee M, Nohr CW, Shizgal HM, MacLean LD (1995) The delayed hypersensitivity response and host resistance in surgical patients. 20 years later. *Ann Surg* 222:534-546; discussion 546-538
37. Chun M, Krim M, Granelli-Piperno A, Hirst JA, Hoffmann MK (1985) Enhancement of cytotoxic activity of natural killer cells by interleukin 2, and antagonism between interleukin 2 and adenosine cyclic monophosphate. *Scand J Immunol* 22:375-381
38. Cinat M, Waxman K, Vaziri ND, Daughters K, Yousefi S, Scannell G, Tominaga GT (1995) Soluble cytokine receptors and receptor antagonists are sequentially released after trauma. *J Trauma* 39:112-118; discussion 118-120
39. Cinelli SM, Brady P, Rennie CP, Tuluca C, Hall TS (2009) Comparative results of trauma scoring systems in fatal outcomes. *Conn Med* 73:261-265
40. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM (1994) A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. *Am J Sports Med* 22:702-710
41. Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M (1990) The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O₂ generation, respectively. *J Clin Invest* 85:1150-1157
42. Culley FJ (2009) Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology* 128:151-163
43. Cumberbatch M, Kimber I (1995) Tumour necrosis factor- α is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology* 84:31-35

44. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ (2009) Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30:626-635
45. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA (1993) Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259:1739-1742
46. Decker P, Singh-Jasuja H, Haager S, Kotter I, Rammensee HG (2005) Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *J Immunol* 174:3326-3334
47. Deenick EK, Tangye SG (2007) Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. *Immunol Cell Biol* 85:503-505
48. Deitch EA (1990) The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 125:403-404
49. Delavary BM, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH (2011) Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*
50. DiPietro LA (1995) Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock* 4:233-240
51. Djaldetti M, Salman H, Bergman M, Djaldetti R, Bessler H (2002) Phagocytosis--the mighty weapon of the silent warriors. *Microsc Res Tech* 57:421-431
52. Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, McDonald DM (1998) Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cell Immunol* 186:18-27
53. Durham RM, Moran JJ, Mazuski JE, Shapiro MJ, Baue AE, Flint LM (2003) Multiple organ failure in trauma patients. *J Trauma* 55:608-616
54. ebrary Inc (2002) The injury chart book a graphical overview of the global burden of injuries. Department of Injuries and Violence Prevention, Noncommunicable Diseases and Mental Health Cluster, World Health Organization, Geneva
55. Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R (1998) Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol* 153:1849-1860
56. Ertel W, Keel M, Bonaccio M, Steckholzer U, Gallati H, Kenney JS, Trentz O (1995) Release of anti-inflammatory mediators after mechanical trauma correlates with severity of injury and clinical outcome. *J Trauma* 39:879-885; discussion 885-877
57. Faunce DE, Gamelli RL, Choudhry MA, Kovacs EJ (2003) A role for CD1d-restricted NKT cells in injury-associated T cell suppression. *J Leukoc Biol* 73:747-755

58. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C (2002) Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195:343-351
59. Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, Bougras G, Muller WA, Moretta L, Munz C (2004) Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16606-16611
60. Fietta P, Delsante G (2009) The effector T helper cell triade. *Riv Biol* 102:61-74
61. Flohe S, Flohe SB, Schade FU, Waydhas C (2007) Immune response of severely injured patients--influence of surgical intervention and therapeutic impact. *Langenbecks Arch Surg* 392:639-648
62. Flohe SB, Bangen JM, Flohe S, Agrawal H, Bergmann K, Schade FU (2007) Origin of immunomodulation after soft tissue trauma: potential involvement of extracellular heat-shock proteins. *Shock* 27:494-502
63. Flohe SB, Flohe S, Schade FU (2008) Invited review: deterioration of the immune system after trauma: signals and cellular mechanisms. *Innate Immun* 14:333-344
64. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336
65. Frasca L, Nasso M, Spensieri F, Fedele G, Palazzo R, Malavasi F, Ausiello CM (2008) IFN-gamma arms human dendritic cells to perform multiple effector functions. *J Immunol* 180:1471-1481
66. Fujimi S, Lapchak PH, Zang Y, MacConmara MP, Maung AA, Delisle AJ, Mannick JA, Lederer JA (2009) Murine dendritic cell antigen-presenting cell function is not altered by burn injury. *J Leukoc Biol* 85:862-870
67. Gallucci S, Matzinger P (2001) Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13:114-119
68. Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71-82
69. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G (2002) Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195:327-333
70. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L (2004) NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 4:231-237
71. Guerrero DM, Perez F, Conger NG, Solomkin JS, Adams MD, Rather PN, Bonomo RA (2010) *Acinetobacter baumannii*-associated skin and soft tissue infections: recognizing a broadening spectrum of disease. *Surg Infect (Larchmt)* 11:49-57

72. Guo Z, Kavanagh E, Zang Y, Dolan SM, Kriynovich SJ, Mannick JA, Lederer JA (2003) Burn injury promotes antigen-driven Th2-type responses in vivo. *J Immunol* 171:3983-3990
73. Hausser G, Ludewig B, Gelderblom HR, Tsunetsugu-Yokota Y, Akagawa K, Meyerhans A (1997) Monocyte-derived dendritic cells represent a transient stage of differentiation in the myeloid lineage. *Immunobiology* 197:534-542
74. Hefeneider SH, Cornell KA, Brown LE, Bakke AC, McCoy SL, Bennett RM (1992) Nucleosomes and DNA bind to specific cell-surface molecules on murine cells and induce cytokine production. *Clinical immunology and immunopathology* 63:245-251
75. Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, Leenen L (2006) Trauma: the role of the innate immune system. *World J Emerg Surg* 1:15
76. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97:889-901
77. Holtmeier W, Kabelitz D (2005) gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy* 86:151-183
78. Homey B (2006) [After TH1/TH2 now comes Treg/TH17: significance of T helper cells in immune response organization]. *Hautarzt* 57:730-732
79. Hoth JJ, Martin RS, Yoza BK, Wells JD, Meredith JW, McCall CE (2009) Pulmonary contusion primes systemic innate immunity responses. *J Trauma* 67:14-21; discussion 21-12
80. Huang LF, Yao YM, Zhang LT, Dong N, Yu Y, Sheng ZY (2008) The Effect of High-Mobility Group Box 1 Protein on Activity of Regulatory T Cells after Thermal Injury in Rats. *Shock* 31:322-329
81. Ishii KJ, Suzuki K, Coban C, Takeshita F, Itoh Y, Matoba H, Kohn LD, Klinman DM (2001) Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol* 167:2602-2607
82. Itano AA, McSorley SJ, Reinhardt RL, Ehst BD, Ingulli E, Rudensky AY, Jenkins MK (2003) Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 19:47-57
83. Janeway CA (2005) *Immunobiology : the immune system in health and disease ; [CD-ROM inside ; animations, videos and figures from the book]*, 6. edn. Garland Science, New York [u.a.]
84. Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL (2002) Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 168:5233-5239
85. Kaczorowski DJ, Mollen KP, Edmonds R, Billiar TR (2008) Early events in the recognition of danger signals after tissue injury. *J Leukoc Biol* 83:546-552

86. Kawasaki T, Fujimi S, Lederer JA, Hubbard WJ, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH (2006) Trauma-hemorrhage induces depressed splenic dendritic cell functions in mice. *J Immunol* 177:4514-4520
87. Kazansky DB (2008) MHC restriction and allogeneic immune responses. *J Immunotoxicol* 5:369-384
88. Keel M, Trentz O (2005) Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 36:691-709
89. Kinnaert P, Mahieu A, Mahieu M, Van Geertruyden N (1983) Effect of surgical trauma on delayed type hypersensitivity. *J Surg Res* 34:227-230
90. Klein J (1979) The major histocompatibility complex of the mouse. *Science* 203:516-521
91. Kobbe P, Vodovotz Y, Kaczorowski DJ, Billiar TR, Pape HC (2008) The role of fracture-associated soft tissue injury in the induction of systemic inflammation and remote organ dysfunction after bilateral femur fracture. *J Orthop Trauma* 22:385-390
92. Kono H, Rock KL (2008) How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8:279-289
93. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* 27:485-517
94. Lahl K, Sparwasser T (2011) In vivo depletion of FoxP3⁺ Tregs using the DEREK mouse model. *Methods Mol Biol* 707:157-172
95. Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C (2007) Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26:519-531
96. Letterio JJ, Roberts AB (1997) TGF-beta: a critical modulator of immune cell function. *Clin Immunol Immunopathol* 84:244-250
97. Li Z, Menoret A, Srivastava P (2002) Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol* 14:45-51
98. Lineberry N, Fathman CG (2006) T cell anergy: where it's LAT. *Immunity* 24:501-503
99. Livingston DH, Appel SH, Wellhausen SR, Sonnenfeld G, Polk HC, Jr. (1988) Depressed interferon gamma production and monocyte HLA-DR expression after severe injury. *Arch Surg* 123:1309-1312
100. Loh SA, Rockman CB, Chung C, Maldonado TS, Adelman MA, Cayne NS, Pachter HL, Mussa FF (2011) Existing trauma and critical care scoring systems underestimate mortality among vascular trauma patients. *J Vasc Surg* 53:359-366
101. Lu L, Ikizawa K, Hu D, Werneck MB, Wucherpfennig KW, Cantor H (2007) Regulation of activated CD4⁺ T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway. *Immunity* 26:593-604
102. Luft T, Jefford M, Luetjens P, Toy T, Hochrein H, Masterman KA, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E (2002) Functionally distinct dendritic

- cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* 100:1362-1372
103. Lunemann A, Lunemann JD, Munz C (2009) Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Mol Med* 15:352-358
 104. Ma DY, Clark EA (2009) The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol* 21:265-272
 105. MacConmara MP, Maung AA, Fujimi S, McKenna AM, Delisle A, Lapchak PH, Rogers S, Lederer JA, Mannick JA (2006) Increased CD4+ CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. *Ann Surg* 244:514-523
 106. MacConmara MP, Tajima G, O'Leary F, Delisle AJ, McKenna AM, Stallwood CG, Mannick JA, Lederer JA (2011) Regulatory T cells suppress antigen-driven CD4 T cell reactivity following injury. *J Leukoc Biol* 89:137-147
 107. Mack VE, McCarter MD, Naama HA, Calvano SE, Daly JM (1996) Dominance of T-helper 2-type cytokines after severe injury. *Arch Surg* 131:1303-1308; discussion 1308-1309
 108. Madler C (2009) Akutmedizin - Die ersten 24 Stunden das NAW-Buch. Urban & Fischer in Elsevier, München
 109. Majetschak M, Krehmeier U, Bardenheuer M, Denz C, Quintel M, Voggenreiter G, Obertacke U (2003) Extracellular ubiquitin inhibits the TNF-alpha response to endotoxin in peripheral blood mononuclear cells and regulates endotoxin hyporesponsiveness in critical illness. *Blood* 101:1882-1890
 110. Majetschak M, King DR, Krehmeier U, Busby LT, Thome C, Vajkoczy S, Proctor KG (2005) Ubiquitin immunoreactivity in cerebrospinal fluid after traumatic brain injury: clinical and experimental findings. *Crit Care Med* 33:1589-1594
 111. Majetschak M (2011) Extracellular ubiquitin: immune modulator and endogenous opponent of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 89:205-219
 112. Makarenkova V, Chakrabarti AK, Liberatore JA, Popovic P, Lu G, Watkins S, Vujanovic NL (2005) Dendritic cells and natural killer cells interact via multiple TNF family molecules. *J Leukoc Biol* 77:408-413
 113. Manderscheid PA, Bodkin RP, Davidson BA, Jensen E, Russo TA, Knight PR (2004) Bacterial clearance and cytokine profiles in a murine model of postsurgical nosocomial pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:742-751
 114. Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA (2001) The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 193:237-244
 115. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5:1260-1265
 116. Matzinger P (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301-305

117. Mazzone A, Segal DM (2004) Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol* 75:721-730
118. Meakins JL, McLean AP, Kelly R, Bubenik O, Pietsch JB, MacLean LD (1978) Delayed hypersensitivity and neutrophil chemotaxis: effect of trauma. *J Trauma* 18:240-247
119. Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-826
120. Meert KL, Ofenstein JP, Sarnaik AP (1998) Altered T cell cytokine production following mechanical trauma. *Ann Clin Lab Sci* 28:283-288
121. Merrer J, Girou E, Lortat-Jacob A, Montravers P, Lucet JC (2007) Surgical site infection after surgery to repair femoral neck fracture: a French multicenter retrospective study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28:1169-1174
122. Metcalf D (1986) The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 67:257-267
123. Moore EC, Pilcher DV, Bailey MJ, Cleland H, McNamee J (2010) A simple tool for mortality prediction in burns patients: APACHE III score and FTSA. *Burns* 36:1086-1091
124. Moore FA, Moore EE, Poggetti R, McAnena OJ, Peterson VM, Abernathy CM, Parsons PE (1991) Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma. *J Trauma* 31:629-636; discussion 636-628
125. Moore FA, Sauaia A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC (1996) Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J Trauma* 40:501-510; discussion 510-502
126. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765
127. Morandi B, Bougras G, Muller WA, Ferlazzo G, Munz C (2006) NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-gamma secretion. *Eur J Immunol* 36:2394-2400
128. Moretta A (2002) Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol* 2:957-964
129. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM (1991) Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 88:1747-1754
130. Murphy K, Travers P, Walport M, Ehrenstein M, Janeway C (2008) Janeway's immunobiology, 7. edn. Garland Science, New York, NY [u.a.]
131. Nakamura T, Lee RK, Nam SY, Podack ER, Bottomly K, Flavell RA (1997) Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype. *J Immunol* 158:2648-2653
132. Ni Choileain N, MacConmara M, Zang Y, Murphy TJ, Mannick JA, Lederer JA (2006) Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury. *J Immunol* 176:225-236

133. Noma T (2010) [Helper T cell paradigm: Th17 and regulatory T cells involved in autoimmune inflammatory disorders, pathogen defense and allergic diseases]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 33:262-271
134. O'Mahony JB, Palder SB, Wood JJ, McIrvine A, Rodrick ML, Demling RH, Mannick JA (1984) Depression of cellular immunity after multiple trauma in the absence of sepsis. *J Trauma* 24:869-875
135. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P (2002) Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2:37-45
136. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164:558-561
137. Omarova SM, Nurmagomedova ZM, Medzhidova D, Mutalipova ZM, Gorelova VG, Alieva AI, Abserkhanova DU (2011) [Antibiotic resistance of *P. aeruginosa* strains isolated from intensive care unit patients at the Makhachkala Traumatology Center]. *Klin Lab Diagn*:46-48
138. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S (2008) Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10113-10118
139. Opal SM, DePalo VA (2000) Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117:1162-1172
140. Oppenheim JJ, Matsushima K, Yoshimura T, Leonard EJ (1987) The activities of cytokines are pleiotropic and interdependent. *Immunol Lett* 16:179-183
141. Oppenheim JJ (2001) Cytokines: past, present, and future. *Int J Hematol* 74:3-8
142. Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 17:359-365
143. Oppenheim JJ, Tewary P, de la Rosa G, Yang D (2007) Alarmins initiate host defense. *Adv Exp Med Biol* 601:185-194
144. Osterloh A, Kalinke U, Weiss S, Fleischer B, Breloer M (2007) Synergistic and differential modulation of immune responses by Hsp60 and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 282:4669-4680
145. Paludan SR (1998) Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand J Immunol* 48:459-468
146. Parish CR (1999) Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 77:499-508
147. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E (2004) Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 279:7370-7377
148. Peres Bota D, Melot C, Lopes Ferreira F, Nguyen Ba V, Vincent JL (2002) The Multiple Organ Dysfunction Score (MODS) versus the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score in outcome prediction. *Intensive Care Med* 28:1619-1624

149. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM (2002) Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195:335-341
150. Pimorady-Esfahani A, Grounds MD, McMenamin PG (1997) Macrophages and dendritic cells in normal and regenerating murine skeletal muscle. *Muscle Nerve* 20:158-166
151. Platt J, Brunn, G., Johnson, G. (2007) Weighing exogenous versus endogenous triggers of SIRS. *Inflamm Res*:109
152. Polk HC, Jr., Cheadle WG, Livingston DH, Rodriguez JL, Starko KM, Izu AE, Jaffe HS, Sonnenfeld G (1992) A randomized prospective clinical trial to determine the efficacy of interferon-gamma in severely injured patients. *Am J Surg* 163:191-196
153. Quill H, Schwartz RH (1987) Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J Immunol* 138:3704-3712
154. Reiter Z (1993) Interferon--a major regulator of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J Interferon Res* 13:247-257
155. Renckens R, van Westerloo DJ, Roelofs JJ, Pater JM, Schultz MJ, Florquin S, van der Poll T (2008) Acute phase response impairs host defense against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice. *Crit Care Med* 36:580-587
156. Robertson JM, Jensen PE, Evavold BD (2000) DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J Immunol* 164:4706-4712
157. Rock KL, Kono H (2008) The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 3:99-126
158. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H (2010) The sterile inflammatory response. *Annual review of immunology* 28:321-342
159. Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Geurts J, Wunderink LU, Schreurs BW, van den Berg WB, Radstake TR (2006) Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 176:7021-7027
160. Romagnani S (1999) Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 5:285-294
161. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA (2003) Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 170:3233-3242
162. Sacks D, Noben-Trauth N (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2:845-858
163. Saraiva M, Christensen JR, Veldhoen M, Murphy TL, Murphy KM, O'Garra A (2009) Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity* 31:209-219

164. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG (2003) TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19:59-70
165. Sethi D, World Health Organization. Regional Office for Europe (2008) Progress in preventing injuries in the WHO European Region : implementing the WHO Regional Committee for Europe resolution ERR/RC55/R9 on prevention of injuries in the WHO European Region and the Recommendation of the Council of the European Union on the prevention of injury and promotion of safety. WHO, Regional Office for Europe, Copenhagen
166. Shevach EM (2009) Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30:636-645
167. Shi Y, Evans JE, Rock KL (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425:516-521
168. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, et al. (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-867
169. Sixt M, Kanazawa N, Selg M, Samson T, Roos G, Reinhardt DP, Pabst R, Lutz MB, Sorokin L (2005) The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* 22:19-29
170. Smith KA (1988) Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240:1169-1176
171. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y (2005) Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42:501-510
172. Starnes MJ, Brown CV, Morales IR, Hadjizacharia P, Salim A, Inaba K, Rhee P, Demetriades D (2008) Evolving pathogens in the surgical intensive care unit: a 6-year experience. *J Crit Care* 23:507-512
173. Strecker W, Gebhard F, Rager J, Bruckner UB, Steinbach G, Kinzl L (1999) Early biochemical characterization of soft-tissue trauma and fracture trauma. *J Trauma* 47:358-364
174. Tacke F, Randolph GJ (2006) Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211:609-618
175. Taniguchi M, Harada M, Kojo S, Nakayama T, Wakao H (2003) The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annual review of immunology* 21:483-513
176. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC (2002) Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 195:99-111
177. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ (2007) Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing

- immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 8:487-496
178. Tidball JG (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R345-353
 179. Trinchieri G (1989) Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47:187-376
 180. Trinchieri G (1995) Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. *Semin Immunol* 7:83-88
 181. Trivedi PP, Roberts PC, Wolf NA, Swanborg RH (2005) NK cells inhibit T cell proliferation via p21-mediated cell cycle arrest. *J Immunol* 174:4590-4597
 182. Tulley JM, Palmer JL, Gamelli RL, Faunce DE (2008) Prevention of injury-induced suppression of T-cell immunity by the CD1d/NKT cell-specific ligand alpha-galactosylceramide. *Shock* 29:269-277
 183. Vincent JL, Bruzzi de Carvalho F (2010) Severity of illness. *Semin Respir Crit Care Med* 31:31-38
 184. Walz CR, Zedler S, Schneider CP, Mayr S, Loehe F, Bruns CJ, Faist E, Jauch KW, Angele MK (2007) Depressed T cell-derived IFN-gamma following trauma-hemorrhage: a potential mechanism for diminished APC responses. *Langenbecks Arch Surg* 392:339-343
 185. Walzer T, Dalod M, Vivier E, Zitvogel L (2005) Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin Biol Ther* 5 Suppl 1:S49-59
 186. Warger T, Hilf N, Rechtsteiner G, Haselmayer P, Carrick DM, Jonuleit H, von Landenberg P, Rammensee HG, Nicchitta CV, Radsak MP, Schild H (2006) Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. *J Biol Chem* 281:22545-22553
 187. Warren GL, O'Farrell L, Summan M, Hulderman T, Mishra D, Luster MI, Kuziel WA, Simeonova PP (2004) Role of CC chemokines in skeletal muscle functional restoration after injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C1031-1036
 188. Watts C (1997) Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annual review of immunology* 15:821-850
 189. Waydhas C, Nast-Kolb D, Jochum M, Trupka A, Lenk S, Fritz H, Duswald KH, Schweiberer L (1992) Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma. *Arch Surg* 127:460-467
 190. Wesselkamper SC, Eppert BL, Motz GT, Lau GW, Hassett DJ, Borchers MT (2008) NKG2D is critical for NK cell activation in host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection. *J Immunol* 181:5481-5489
 191. Yanagawa Y, Iwabuchi K, Onoe K (2009) Co-operative action of interleukin-10 and interferon-gamma to regulate dendritic cell functions. *Immunology* 127:345-353

192. Yang D, Rosenberg HF, Chen Q, Dyer KD, Kurosaka K, Oppenheim JJ (2003) Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), an antimicrobial protein with chemotactic activities for dendritic cells. *Blood* 102:3396-3403
193. Yang D, Chen Q, Rosenberg HF, Rybak SM, Newton DL, Wang ZY, Fu Q, Tchernev VT, Wang M, Schweitzer B, Kingsmore SF, Patel DD, Oppenheim JJ, Howard OM (2004) Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation. *J Immunol* 173:6134-6142
194. Yona S, Jung S (2010) Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* 17:53-59
195. Youngblood B, Davis CW, Ahmed R (2010) Making memories that last a lifetime: heritable functions of self-renewing memory CD8 T cells. *Int Immunol* 22:797-803
196. Yrlid U, Jenkins CD, MacPherson GG (2006) Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *J Immunol* 176:4155-4162
197. Zanetti M (2004) Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* 75:39-48
198. Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, Cohen IR (2006) Heat shock protein 60 enhances CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest* 116:2022-2032
199. Zhan Y, Xu Y, Seah S, Brady JL, Carrington EM, Cheers C, Croker BA, Wu L, Villadangos JA, Lew AM (2010) Resident and monocyte-derived dendritic cells become dominant IL-12 producers under different conditions and signaling pathways. *J Immunol* 185:2125-2133
200. Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ (2010) Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock* 34:55-59
201. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ (2010) Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464:104-107
202. Zinkernagel RM, Doherty PC (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248:701-702
203. Zygun D, Berthiaume L, Laupland K, Kortbeek J, Doig C (2006) SOFA is superior to MOD score for the determination of non-neurologic organ dysfunction in patients with severe traumatic brain injury: a cohort study. *Crit Care* 10:R115

8. ANHANG

8.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

Abb.	Abbildung
APACHE	<i>Acute physiology and chronic health evaluation</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	<i>Adenosin-Tri-Phosphat</i>

B

BMC	<i>Bone-marrow cell</i>
BMDC	<i>Bone-marrow-derived dendritic cell</i>
bzw.	beziehungsweise

C

ca.	zirka
CARS	<i>compensatory anti-inflammatory response syndrome</i>
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Lymphozytendifferenzierungsgruppe)
CFDA-SE	<i>CarboxyFluoroscein Diacetat Succinimidyl Ester</i>
CFSE	CarboxyFluoroscein Succinimidyl Ester
CFU	<i>Colony forming unit</i>
ConA	Concanavalin A
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CTL	zytotoxische T-Zellen
Cy	Cyanin
Cy7/ Cy5.5	Cyaninfarbstoffe

D

DAMP	<i>damage associated molecular patterns</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i> (dendritische Zelle)
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>

E

EDN	<i>eosinophil-derived neurotoxin</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EU	Europäische Union

F

FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fötales Kälberserum)
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanat</i>
FL2-H	<i>rot fluoreszierender Farbkanal</i>
Foxp3	<i>Forkhead box protein 3</i>
FSC	<i>Forward-scattered</i> (Vorwärtsstreulicht)

G

GM-CSF	Granulozyten-/ Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Gp	Glykoprotein (Hitzeschockprotein)
Gy	Gray

H

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HMGB1	<i>high mobility group box 1</i>
HRP	<i>Horseradish</i> (Meerrettich) Peroxidase
HSP	Hitze-Schock-Protein

I

ICU	<i>Intensive care unit</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.m.	Intramuskulär
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
iTreg	induzierte Treg
i.v.	intravenös

K

KCl	Kaliumchlorid
-----	---------------

L

LN	<i>Lymph Node</i> (Lymphknoten)
LNC	<i>Lymph Node Cells</i> (Lymphknotenzellen)

M

MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MFI	<i>Median fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MODS	Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom
MOF	<i>Multi organ failure</i> (Multi-Organversagen)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>

N

NaCl	Natriumchlorid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer- T-Zelle
nTreg	Natürlich vorkommende Treg

O

OVA	Ovalbumin-Protein
-----	-------------------

P

PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphat-buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PECy7	Phycoerythrin konjugiert mit Cy7

PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PerCPCy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Protein konjugiert mit Cy5.5
<i>PGE₂</i>	Prostaglandin E ₂
pOVA	Ovalbumin-Peptid
PRR	<i>pathogen</i> oder <i>pattern recognition receptors</i>
R	
Rag2	<i>recombination activating gene 2</i>
RNA	<i>Ribo nucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RT	Raumtemperatur
S	
SAV	Streptavidin
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
s.c.	subkutan
SD	<i>standard deviation</i>
SOFA	<i>Sequential organ failure assessment</i>
SSC	<i>Side-scattered</i> (Seitwärtsstreulicht)
sTNF-R	<i>Soluble TNF Receptor</i>
T	
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
T _H	T-Helfer-Zelle
T _H 1/ 2	T-Helfer-Zelle des Typs 1/ 2
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TSC	<i>total spleen cells</i>
Treg	T-regulatorische Zellen
TSA	<i>Tryptic soy agar</i>
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitan monolaurat
V	
v/ v	<i>by volume</i>
VLE	<i>Very Low Endotoxin</i>
W	
WHO	<i>World Health Organisation</i>
Z	
z. B.	Zum Beispiel
ZTL	Zentrales Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen

Für Mengen-, Größen-, Zeit- oder andere physikalische Angaben wurden SI- (Internationales Einheitensystem) oder gesetzliche Einheiten gewählt.

8.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1 Induktion der angeborenen Immunität.....	3
Abb. 1.2 Die NK-Zelle als Regulator und Initiator.....	5
Abb. 1.3 Schematische Darstellung der T-Lymphozyten Differenzierung.....	8
Abb. 1.4 Modell der T _H 1-/ T _H 2-Differenzierung.....	12
Abb. 1.5 Zelltod und Inflammation.	16
Abb. 3.1 Applikation eines geschlossenen Weichteiltraumas.....	27
Abb. 3.2 Prinzip der positiven Selektion des magnetic associated cell sorting (MACS).....	34
Abb. 3.3 Schematische Darstellung des Mechanismus der CFSE-Markierung von Zellen.	37
Abb. 3.4 Lichtstreuungs-Eigenschaften einer Zelle.....	40
Abb. 3.5 Schematische Darstellung der Methode des Sandwich ELISA.....	43
Abb. 3.6 Versuchsverlauf zur Untersuchung der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung in vivo	46
Abb. 4.1 Anreicherung von CD3 ⁺ DO11.10 Zellen.....	49
Abb. 4.2 Aktivierungszustand von CD4 ⁺ DO11.10 Zellen nach s.c. Applikation von OVA.....	50
Abb. 4.3 Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen in vivo.....	51
Abb. 4.4 Subkutane Antigen-Applikation. Zytokin-Expression der LNC nach Restimulation.....	52
Abb. 4.5 OVA-FITC ⁺ DC im LN von Kontroll- und Trauma-behandelten Tieren.....	54
Abb. 4.6 Versuchsverlauf zur Untersuchung einer Beeinträchtigung von APZ nach Trauma.....	55
Abb. 4.7 Reinheit der generierten BMDC.....	56
Abb. 4.8 Aktivierungszustand von CD4 ⁺ DO11.10 Zellen nach s.c. Applikation von OVA- beladenen BMDC:	57
Abb. 4.9 Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen in vivo.....	58
Abb. 4.10 Zytokin-Expression nach Applikation von OVA-beladenen BMDC in vitro.....	59
Abb. 4.11 Versuchsverlauf zur Untersuchung der Beteiligung von endogenen T-Zellen.....	60
Abb. 4.12 Aktivierungszustand von CD4 ⁺ DO11.10 Zellen nach Adoptivtransfer von T-Zellen aus Trauma-behandelten Tieren:.....	61
Abb. 4.13 Einfluss endogener T-Zellen. Zytokin-Expression der LNC nach Restimulation.....	62
Abb. 4.14 Versuchsverlauf zur Untersuchung der Beteiligung von endogenen T-Zellen in RAG-2 knockout Mäusen.	63

Abb. 4.15 Aktivierungszustand von CD4 ⁺ DO11.10 Zellen in RAG-2 ^{-/-} Tieren:	64
Abb. 4.16 Immunantwort Antigen-spezifischer T-Zellen in RAG-2 ^{-/-} Mäusen:	65
Abb. 4.17 Untersuchung endogener T-Zellen in einem T-Zell Assay in vitro:	66
Abb. 4.18 Anreicherung von CD3-negativen LNC:	67
Abb. 4.19 Zytokin-Expression im T-Zell Assay in vitro:	67
Abb. 4.20 Versuchsverlauf zur Inaktivierung/Depletion von NK-Zellen in vivo:	69
Abb. 4.21 Effekt der NK-Zell Depletion durch Anti asialo Serum:	69
Abb. 4.22 Aktivierungszustand von CD4 ⁺ DO11.10 Zellen nach NK-Zell Depletion	70
Abb. 4.23 Zytokin-Expression nach NK-Zell-Inaktivierung in vitro:	71
Abb. 4.24 Aktivierungszustand von NK-Zellen nach Trauma:	72
Abb. 4.25 Versuchsverlauf im Lungeninfektionsmodell mit P. aeruginosa in vivo:	73
Abb. 4.26 Bakterielle Beladung der Lungen nach P. aeruginosa Infektion in der Lunge	74
Abb. 4.27 Gatingstrategie zur Betrachtung von DC und Monozyten/ Makrophagen im Muskel:	75
Abb. 4.28 Charakterisierung von APZ im Muskel:	76
Abb. 4.29 Expression co-stimulatorischer Moleküle auf DC im Muskel von IFN- γ ^{-/-} Mäusen:	77
Abb. 4.30 Aktivierungszustand von CD4 ⁺ DO11.10 Zellen nach i.m. Applikation von OVA:	79
Abb. 4.31 Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen in vivo:	80
Abb. 4.32 Intramuskuläre Antigen-Applikation. Zytokin-Expression der LNC nach Restimulation:	81
Abb. 4.33 Umkehr der T _H -Suppression nach Trauma über Dendritische Zellen im Muskel:	83
Abb. 4.34 Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen in vivo:	84
Abb. 4.35 Subkutane mit vorhergehender intramuskulärer Antigen-Applikation. Zytokin- Expression der LNC nach Restimulation:	85

8.3. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte	20
Tabelle 2.2 Puffer und Lösungen	21
Tabelle 2.3 Reagenzien und Stimuli	22
Tabelle 2.4 Antikörper	24

8.4. DANKSAGUNG

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

8.5. LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

8.6. ERKLÄRUNGEN

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Pathogenese der Immunsuppression nach stumpfem Weichteiltrauma“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Florian Wirsdörfer befürworte.

Essen, den _____

Stefanie B. Flohé

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Florian Wirsdörfer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Florian Wirsdörfer